

MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Prekancerózy a karcinom hrtanu

Habilitační práce v oboru otorinolaryngologie

Komentovaný soubor prací

MUDr. Martin Formánek, Ph.D.

Brno 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že předložená práce je původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, ze kterých jsem čerpal, v práci řádně cituji a jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Ostravě dne: 1.7.2023

MUDr. Martin Formánek, Ph.D.

OBSAH

1 ÚVOD	4
2 TEORETICKÁ ČÁST	5
2.1 Prekancerózy a karcinom hrtanu	5
2.1.1 Recidivující respirační papilomatóza hrtanu	6
2.1.2 Laryngofaryngeální reflux	12
2.2 Vyšetřovací metody hrtanu	14
2.2.1 Anamnéza a příznaky	15
2.2.2 Vizuální vyšetřovací metody	15
2.2.3 Histologická diagnostika	21
2.2.4 Diagnostika lidských papilomavirů	22
2.2.5 Diagnostika laryngofaryngeálního refluxu	23
2.2.6 Vyšetření hlasu	25
2.2.7 Vyšetření polykání	27
2.3 Léčba	27
2.3.1 Nechirurgická léčba	27
2.3.2 Chirurgická léčba	29
3 SOUHRN VLASTNÍCH VÝSLEDKŮ	35
3.1 Diagnostika prekanceróz a karcinomu hrtanu	35
3.1.1 Výzkum rizikových faktorů recidivující respirační papilomatózy	35
3.1.2 Diagnostika refluxní laryngitidy a laryngofaryngeálního refluxu	43
3.1.3 Využití nových optických metod	48
3.2 Léčba prekanceróz a karcinomu hrtanu a jejích následků	51
3.2.1 Chirurgická léčba	51
3.2.2 Nechirurgická léčba	54
4 ZÁVĚR	56
5 LITERATURA	58
6 PŘÍLOHY	74
7 PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORA K TÉMATU PRÁCE	136
8 SEZNAM ZKRATEK	141
9 PODĚKOVÁNÍ	142

1 ÚVOD

Předkládaná habilitační práce v oboru otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku je koncipována jako soubor komentovaných publikovaných prací, které jsou věnovány prekancerózám a karcinomu hrtanu – jejich rizikovým faktorům, diagnostice, chirurgické i nechirurgické léčbě. Této oblasti se dostává díky pokroku v léčivech i technologiích v poslední době stále větší pozornosti. Pracoviště autora tento trend v samotném počátku zachytilo, laryngologii v celé šíři se intenzivně věnovalo, pořádalo mezinárodní workshopy na toto téma a své zkušenosti si vyměňovalo s pracovišti po celém světě. Díky tomu nejen poskytovalo péči na úrovni srovnatelné s nejvýznamnějšími pracovišti, ale bylo schopno podílet se na dalším pokroku v oboru také svým výzkumem. Součástí výzkumného týmu byl také autor předkládané práce. Publikace jsou prezentovány v druhé části habilitační práce jako „Souhrn vlastních výsledků“.

V první části práce jsou pro lepší přehlednost nejprve představeny prekancerózy hrtanu, teoreticky shrnuty současné vyšetřovací metody hrtanu a možnosti chirurgické i nechirurgické léčby.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Prekancerózy a karcinom hrtanu

Přednádorové léze hrtanu (prekancerózy) jsou patologické změny epitelu sliznice hrtanu, které mají statisticky vyšší potenciál maligní transformace směrem ke karcinomu nebo vyšší riziko přítomnosti mikrokarcinomu či karcinomu in situ v době klinické diagnózy. Jediným spolehlivým vyšetřením k přesnému posouzení biologické povahy přednádorové léze, případně k určení tíže dysplastických změn, je mikroskopické (histologické) vyšetření ložiska.

Páté vydání WHO klasifikace nádorů hlavy a krku z roku 2022 rozlišuje dva základní typy přednádorových lézí hrtanu (WHO 2022):

- *dlaždicobuněčný papilom a papilomatózu (RRP)*;
- *laryngeální epiteliální dysplazii*.

V širším slova smyslu se o prekancerózách mluví i v případě přítomnosti makroskopických změn sliznice hrtanu (např. leukoplakie, erytroplakie, pachydermie). Skutečný potenciál maligní transformace (stupně dysplazie) však nelze z makroskopického charakteru léze určit, a proto ne všechny tyto léze jsou prekancerózami v pravém slova smyslu (Gale 2014).

- Leukoplakie je bělavá skvrna na sliznici, kterou nelze setřít a kterou nelze klasifikovat jako jiné diagnostikovatelné onemocnění. Dysplastické změny (lehké nebo těžké) bývají prokázány u zhruba 50 % leukoplakií (Ali 2019, Isenberg 2008). Leukoplakie mohou být homogenní nebo nehomogenní. Homogenní leukoplakie je plochá, tenká, uniformně bělavá. Nehomogenní leukoplakie mají vyšší riziko maligní transformace a je potřeba je léčit agresivněji. Mohou mít charakter erozivní, nodulární nebo verukózní léze. Vyšší riziko těžké dysplazie a karcinomu in situ bylo prokázáno u pacientů ve vyšším věku.
- Erytroplakie je růžová až červená nestíratelná skvrna na sliznici, může být hladká nebo granulovaná. Důvodem červeného zbarvení je výrazná novotvorba cév. Ve srovnání s leukoplakií má erytroplakie vyšší maligní potenciál, frekvence jejího výskytu je však nižší. Pokud má erytroplakie i bělavé okrsky označuje se jako erytroleukoplakie.
- Hypertrofie je prosté zbytnění tkáně, které vzniká při dlouhodobé iritaci, nejčastěji jako následek vleklých zánětů, kouření nebo traumatu.
- Pachydermie je lokalizované, obvykle nerovné zhrubnutí sliznice. V hrtanu se častěji vyskytuje v oblasti zadní komisury. Je považováno za jeden z možných znaků laryngofaryngeálního refluxu (LPR).

- Monochorditida je popisný název pro nález jednostranných (asymetrických) změn na hlasivce (zarudnutí, ztlustění, prosáknutí, leukoplakie). Monochorditida je vždy onkologicky suspektní nález, v diferenciální diagnóze se může jednat o hematom hlasivky, tuberkulózu nebo dnes vzácně syfilis hrtanu, případně jiná např. granulomatózní onemocnění hrtanu.

Prekancerózy hrtanu mají ve Spojených státech amerických incidenci 10,2/ 100 000 mužů a 2,1/ 100 000 žen. Karcinom hrtanu je jeden z nejčastějších nádorů v oblasti hlavy a krku. Vychází nejčastěji z dlaždicobuněčného epitelu. Dalšími (pod)typy jsou papilokarcinom, verukózní karcinom a vřetenobuněčný karcinom. Karcinom hrtanu postihuje více muže, ale stoupá i postižení žen. Incidence karcinomu hrtanu v České republice se stabilně pohybuje mezi 3–4/ 100 000 obyvatel ročně. Příznaky a prognóza se odvíjí od lokalizace nádoru.

Specifickým typem maligního postižení je pak chondrosarkom, který nejčastěji postihuje prstencovou chrupavku. Tomuto onemocnění byly věnovány publikace autora (Fedorová 2021, Formánek 2013).

Problematika RRP bude probrána v samostatné kapitole (viz 2.1.1). Dalšími prokázanými rizikovými faktory prekanceróz hrtanu (dysplazií) jsou kouření a konzumace alkoholu, přičemž je potvrzeno jejich synergické působení a nárůst rizika při kombinaci obou faktorů. Za potenciální rizikový faktor je považován také laryngofaryngeální (mimojícnový) reflux (viz 2.1.2) a porucha imunity. Roli nejspíš hraje i genetika.

2.1.1 Recidivující respirační papilomatóza hrtanu

Zařazení RRP mezi prekancerózy hrtanu je z důvodu přítomnosti rizika maligní transformace papilomů a vzniku karcinomu. Problematice RRP autor věnoval svou monografii, která bude citována a pro potřeby práce výrazně zestručněna (Formánek 2022). RRP je benigní nádorové onemocnění infekčního původu vycházející z dlaždicobuněčného epitelu. Jedná se o sexuálně přenosné onemocnění, které je charakterizováno vznikem dlaždicobuněčných papilomů na sliznicích aerodigestivního traktu. Nicméně možností přenosu infekce mezi těmito oblastmi je celá řada, např. autoinokulace nebo vertikální přenos z matky na dítě s rizikem přenosu 1:80–1:1 500 při nekomplikovaném vaginálním porodu (Silverberg 2003). Hlavním rizikovým faktorem pro vznik RRP je přítomnost lidských papilomavirů (HPV), nejčastěji tzv. nízké rizikového typu 6 nebo 11, které onemocnění v drtivé většině případů vyvolávají.

Papilomaviry jsou malé neobalené viry z čeledi Papillomaviridae o velikosti 55 nm. Kapsida ikosahedrální symetrie je tvořena 72 kapsoméry a je dominantně složena z pentamerů

proteinu L1, s kterými je asociován minoritní protein L2. V současnosti je známo více než 220 typů HPV. Na základě sekvenční podobnosti genomu pro kapsidový protein L1 se rozdělují do 5 rodů označených řeckými písmeny α , β , γ , μ a ν (liší se více než v 60 % sekvence genu L1). Mezi klinicky nejvýznamnější patří α -HPV, které infikují bazální buňky sliznic především anogenitální oblasti mužů i žen, ale také sliznice v oblasti hlavy a krku. Podle onkogenního potenciálu lze HPV rozdělit na nízké rizikové a vysoce rizikové.

Virový genom je tvořen kruhovou dvouvláknovou DNA o velikosti přibližně 8 kpb (kilo-párů bází). Genom HPV kóduje 7–9 virových genů a má podobnou organizaci u všech známých typů HPV. Lze ho rozdělit do třech částí. Nekódující dlouhou regulační oblast (long control region), která obsahuje replikační počátek, vazebná místa pro virové proteiny E1 a E2, časný promotor a vazebná místa pro transkripční faktory. Dále časnou (early) oblast, která obsahuje geny pro nestrukturální časné proteiny E1–E8, v genu E7 je také lokalizovaný pozdní promotor, a pozdní (late) oblast, která obsahuje geny pro strukturální proteiny virové kapsidy L1 a L2.

Virové proteiny E6 a E7 mají společně s proteinem E5 transformační potenciál a označují se jako virové onkoproteiny. Virový protein E6 prostřednictvím buněčné ubikvitinové ligázy E6AP váže nádorový supresorový protein p53, který je poté degradován v proteasomu. V důsledku toho dochází k potlačení vstupu infikovaných buněk do apoptózy. Dále bylo prokázáno, že protein E6 je schopen aktivovat a udržovat během opakovaných buněčných dělení funkci buněčné telomerázy (Galloway 2005, Ganti 2015). Virový protein E7 způsobuje destabilizaci proteinů patřících do rodiny retinoblastomového proteinu pRb (p105, p107 a p130), které se podílejí na kontrole vstupu epitelálních buněk do buněčného cyklu. Vazba E7 proteinu vede k uvolnění transkripčního faktoru E2F z pRb a ten následně zahájí transkripci buněčných genů. Protein E7 dále u vysoce rizikových HPV navozuje nestabilitu buněčného genomu deregulací buněčného cyklu. Virový protein E6 a E7 stimulují buněčnou proliferaci bazálních a parabazálních buněk také prostřednictvím aktivace četných signálních drah, např. Akt, Wnt a Notch. Virový transmembránový protein E5 podporuje stabilizaci receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), zvýšení jejich exprese a citlivosti, a tím přispívá ke stimulaci proliferační signální dráhy.

Viry infikují vnímavé buňky přechodového epitelu, který se nachází v místě skvamokolumnární junkce (Herfs 2012). Skvamokolumnární junkce je místo přechodu mnohvrstevného dlaždicobuněčného epitelu v epitel respirační, víceřadý cylindrický s řasinkami. Buňky v této oblasti mají v blízkosti bazální membrány vysokou proliferační aktivitu a jsou schopny se diferencovat jak do dlaždicobuněčného, tak do respiračního epitelu. Junkční oblast je proto také někdy nazývána jako metaplastická nebo transformační zóna. Oblasti

skvamo-kolumnární junkce se v dýchacích a polykacích cestách nacházejí v limen nasi, na části měkkého patra obrácené do nosohltanu, ve střední části laryngeální plochy epiglottis, při horní a dolní hranici ventrikulu, na hlasivkách (linea arcuata superior a linea arcuata inferior), v oblasti kariny průdušnice a bronchiálních chrupavek. Iatrogeně je oblast skvamo-kolumnární junkce vytvořena tracheostomií, kde se nachází v části průdušnice přilehlé k tracheostomii. Dále je možné nalézt skvamo-kolumnární junkci v močové trubici, na děložním čípku a anorektálním přechodu.

Vstup viru se děje přes mikrotraumata a eroze v epitelu, přes které se dostane k méně diferencovaným buňkám v oblasti bazální membrány, které jsou ještě stále schopné proliferace (Stanley 2012, Valencia 2008, zur Hausen 1996). Samotná adsorpce viru na hostitelkou buňku není zcela jasná. Dle in vitro studií se tak děje pomocí heparin sulfátových proteoglykanů, tyto receptory nicméně nehrají specifickou roli v přenosu infekce, protože jsou exprimovány na všech buňkách napříč epitelem, ale viry primárně infikují pouze buňky v blízkosti bazální membrány. Některými studii je v adsorpci viru zvažována také úloha $\alpha 6$ integrinu, který je častěji exprimován buňkami v blízkosti bazální membrány, nicméně HPV jsou schopny adsorpce také na buňky, které tento receptor neexprimují (Culp 2006).

Po infikování dojde ke změně signálních cest v buňkách. V postižených buňkách je například zvýšena exprese EGFR a také je navýšena jejich citlivost. Citlivost je zvýšena do té míry, že práh aktivace je snížen nejméně 10krát (Johnston 1999). Byla také prokázána silná exprese receptorů pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a jeho zvýšená tvorba (Rahbar 2005). Mezi další změny patří aktivace fosfoinositol-3-kinázy, p38 MAP kinázy, aktivace jaderného faktoru kappa B a zvýšení hladiny přenašeče Rac1, kterým ovlivňuje EGFR expresi cyklooxygenázy 2, jejího produktu prostaglandinu E₂, a takto reguluje diferenciaci a apoptózu buňky (Vancurova 2002, Wu 2005 a 2007, Zhang 2000). V buňkách spodních vrstev epitelu dochází k replikaci virového genomu do počtu přibližně 50 kopií na buňku a omezené transkripci časných virových genů E1 a E2, které replikaci virových genomů regulují. Protein E2 zároveň funguje jako transkripční faktor časných virových genů E6 a E7. Jejich produkty interagují ve vzájemné součinnosti s celou řadou buněčných proteinů, což vede k výraznému narušení regulace diferenciaci epiteliálních buněk a buněčné proliferace a ke změnám buněčného mikroprostředí, které může zpětně ovlivňovat expresi virových genů (Mangino 2016).

Následkem výše popsaných změn je expanze buněk podobných buňkám v blízkosti bazální membrány do vyšších vrstev epitelu, zablokování apoptózy a urychlení množení buněk. Je blokována také terminální diferenciaci buněk. Dochází k akumulaci dlaždicových buněk

s jejich sníženou ztrátou na povrchu epitelu (Steinberg 1990, zur Hausen 2002). Vzhledem k tomu, že celý cyklus viru se odehrává nad bazální membránou a bez způsobení lýzy buněk, reakce imunitního systému je minimální (Bonagura 2010, Campo 2010, Ivancic 2019).

Zatím nedostatečně objasněná je otázka přirozeného výskytu HPV. Asymptomatické nosičství HPV je obecně mnohem vyšší než prevalence patologií. V dutině ústní zdravé populace byla ve studiích prevalence všech typů HPV sledována ve 2–9 % případů, prevalence rizikových typů menší (Simonidesová 2018, Tam 2018). U novorozenců až ve 22 % případů (Rintala 2005). Prevalence asymptomatické HPV infekce v hltanu dospělých je, mimo jiné z důvodu obtížnějšího získávání vzorku, u skutečně zdravé populace výrazně méně referována. Využívána jsou především data od pacientů podstupujících tonzilektomii pro benigní onemocnění. Prevalence HPV v této tkáni je odhadována na 0–3,6 % (Combes 2017, Ilmarinen 2017, Palmer 2014). Prevalence v hrtanu u zdravých osob není známá. Lze pouze předpokládat, že vzhledem k mechanismu přenosu by se směrem aborálním mohla dále snižovat. Převážná většina dospělých infekci eliminuje během měsíců až roků. Jen u zlomku z nich infekce perzistuje a až po delším, zatím těžce odhadnutelném časovém intervalu, může dojít k vývoji virem indukovaného onemocnění.

Podle věku, ve kterém se RRP objeví, je klinicky rozlišována dětská (juvenilní) a dospělá forma. Neexistuje však zcela striktní hranice, která by říkala, do kterého věku začátku onemocnění se ještě jedná o dětskou formu. Nejčastěji je zmiňován věk mezi 18 až 20 lety. V kontrastu s maligními nádory hlavy a krku způsobenými HPV v norské studii mapující období 1987 až 2009 nebyly potvrzeny odhady narůstající incidence dětské ani dospělé formy RRP (Omland 2012). V rozsáhlých národních studiích nebyl sledován výraznější rozdíl v zastoupení jednotlivých pohlaví u pacientů s RRP.

RRP je nejčastěji lokalizována v oblasti hrtanu. V literatuře bývá popisována bimodální distribuce věku pacientů, ve kterém se RRP poprvé objevuje v 5 a 30 letech. Nicméně tato distribuce byla v poslední době zpochybněna. V analýze počátku RRP existuje věková distribuce trimodální – s maximy v 7, 36 a navíc v 64 letech (San Giorgi 2016). Údaj přímo koreluje s výsledky studií zabývajících se nosičstvím HPV v oblasti hlavy a krku v populaci (Gillison 2012).

V současnosti je udávaná incidence dětské RRP 0,024–1,34 na 100 000 dětí za rok, prevalence pak 0,81–3,88 na 100 000 dětí, s vyššími počty v afrických zemích a u veřejně (nesoukromě) pojištěných dětí ve Spojených státech amerických (tab. 2.1). Rozdílná incidence dětské formy RRP může souviset se skutečností, že je častěji sledována u dětí pocházejících ze socioekonomicky slabších rodinných poměrů a s různým stavem očkování proti HPV

v jednotlivých zemích. Příkladem je Austrálie, která již v roce 2007, jako jedna z prvních zemí na světě, zavedla plošný program HPV vakcinace kvadruvalentní vakcínou pro dívky ve věku 12–26 let a školních dětí ve věku 12–13 let (chlapci i dívky). V současné době je zde proočkovanost v 15 letech u dívek až 86 % a u chlapců až 79 %. Díky tomu došlo k praktickému vymizení genitálních bradavic (Osborne 2015). Pětiletá prospektivní studie dětí s RRP hrtanu zde také potvrdila signifikantní pokles incidence z 0,163 případů na 100 000 dětí v roce 2012 (5 let po začátku očkování) na 0,024 případů na 100 000 dětí v roce 2016 (Novakovic 2018). Naopak např. v Africe lze očekávat, že jsou počty spíše poddiagnostikované, uvážíme-li horší dostupnost lékařské péče v této lokalitě.

Incidence dospělé formy RRP je obecně méně referována. Je odhadována na 0,18–0,54 na 100 000 dospělých za rok (tab. 2.2). Obecně platí, že v méně vyspělých zemích je větší incidence/prevalence dětské RRP než dospělé formy. Ve vyspělejších zemích je tomu pak přesně obráceně.

Tab. 2.1 Incidence a prevalence dětské RRP na 100 000 dětí v jednotlivých zemích (Formánek 2022).

Země	Incidence	Prevalence	Poznámka	Citace
Norsko	0,17	x	častěji u chlapců, medián začátku 4 roky	Omland 2012
USA (soukromé pojištění)	0,51	1,45	nejvyšší incidence 0–4 roky	Marsico 2014
USA (veřejné pojištění)	1,03	2,93	nejvyšší incidence 0–4 roky	Marsico 2014
Kanada	0,24	1,11		Campisi 2010
Jihoafrická republika	1,34	3,88	medián začátku 3,2 (HPV 11) a 5,4 roku (HPV 6)	Seedat 2018
Austrálie (2000-2013)	x	0,81	0,9 (2007) x 0,79 (2012), medián začátku 3 roky	Novakovic 2016
Austrálie (2012)	0,163	x	60 % u prvorozených, 87 % u	Novakovic 2018
Austrálie (2016)	0,024	x	porodů vaginální cestou	Novakovic 2018

Tab. 2.2 Incidence a prevalence dospělé RRP na 100 000 dospělých v jednotlivých zemích (Formánek 2022).

Země	Incidence	Prevalence	Poznámka	Citace
Norsko	0,54	x	častěji u mužů, medián začátku 34 let	Omland 2012
Jihoafrická republika	0,18	0,38	medián začátku 30,7 (HPV 11) a 40 let (HPV 6)	Seedat 2018

Při porovnání četnosti kolonizace horních cest dýchacích HPV viry a incidence RRP je patrné, že pouze u menšiny pacientů s HPV tedy dojde ke vzniku RRP. Lze předpokládat, že do patogeneze RRP musí být zapojeny další faktory, které potencují HPV infekci nebo brání eliminaci HPV z organismu, a spolupodílí se tak na vzniku a progresi onemocnění. Tyto rizikové (ko)faktory nejsou zatím zcela známé a existují snahy o jejich identifikaci. Jako jedny z takových faktorů jsou uvažovány stav imunitního systému, kouření, LPR a také současná infekce (koinfekce) dalšími patogeny, které, obdobně jako HPV, cílí na stejné místo v lidském těle, na bazální vrstvu epitelu (Formánek 2019 a 2021 a 2022, Gluvalić 2022). Je zvažován také vliv genetiky (Palomares-Marin 2021).

Průběh RRP je vysoce individuální, u každého jedince bývá zcela odlišný. RRP má tendenci k častým recidivám a šíření. Z oblasti hrtanu, kde se vyskytuje nejčastěji, se může šířit dále do dolních dýchacích cest. Bez léčby se může vyvinout až v život ohrožující stav. Bylo vyzorováno několik faktorů, které jsou obecně spojeny s horším průběhem RRP (Bedard 2021, Li 2022, Xi 2020):

- RRP způsobená HPV 11;
- nižší socioekonomický status;
- brzký začátek onemocnění a dětská forma onemocnění;
- přítomnost kondylomat u matky v průběhu těhotenství.

Přibližně u 5 % pacientů s dětskou RRP dojde v průběhu onemocnění k šíření papilomů do dolních dýchacích cest a u části až do plic. Časový interval vývoje je přibližně 10–20 let. Chirurgické odstranění papilomů je zde problematické, proto mohou způsobovat obstrukci dýchacích cest a způsobit následný rozvoj plicní kavítace a eventuálně smrt. V plicích papilomech může rovněž dojít k maligní transformaci a vzniku karcinomu plic.

Šíření papilomů bývá vysvětlováno dvěma teoriemi:

- přímá migrace postižených buněk díky zhoršené clearance dýchacích cest HPV infekcí;

- nezávislá reaktivace latentní HPV infekce v místě reparace po předchozím poranění nebo v místě s dlaždicobuněčnou metaplazií.

Obecně platí, že čím je doba trvání onemocnění delší, tím je riziko maligní transformace větší. Lie et al. uvádí vznik karcinomu u 7,8 % z celkového počtu 102 pacientů s RRP. Vznik byl sledován za 4–55 let od diagnostiky RRP (Lie 1994). Z novějších studií referoval o maligní transformaci RRP Karatayli-Ozgursoy et al., který retrospektivně hodnotil 159 pacientů s RRP v posledních 10 letech (tzn. doba sledování 10 let a méně) (Karatayli-Ozgursoy 2016). Maligní transformace byla zaznamenána u 5 % pacientů s dospělou i dětskou formou RRP, u dospělé formy byl navíc sledován vývoj těžké dysplazie nebo karcinomu in situ u 10 % pacientů. Nebyl zatím vysledován jiný rizikový faktor maligní transformace než časný věk při začátku onemocnění. Vlastní mechanismus transformace není zatím dostatečně objasněn.

2.1.2 Laryngofaryngeální reflux

Laryngofaryngeální (mimojícnový, extraezofageální) reflux (LPR) je definován jako stav, při kterém dochází k návratu refluxátu nad úroveň horního jícnového (Kiliánova) svěrače do oblasti horních i dolních dýchacích cest, hltanu a dutiny ústní. V refluxátu je obsaženo mnoho látek, některé z nich mají velmi agresivní charakter. K hlavním agresivním látkám, které se podílejí na jeho patologických vlastnostech, patří kyselina chlorovodíková (HCl), pepsin, žlučové kyseliny a pankreatické enzymy, přičemž HCl a pepsin jsou látky nejškodlivější (Zeleník 2013). Pepsin jako hlavní proteolytický enzym gastrointestinálního traktu má na buňky četne negativní účinky (tab. 2.3). Ke své aktivaci potřebuje kyselé prostředí. Jeho maximální enzymatická aktivita je při pH 1,5–2,0, inaktivován je až při pH 6,5, poté zůstává stabilní až do pH 8,0. Ve studii Johnstona et al. bylo navíc prokázáno, že inaktivovaný pepsin může být při reacidifikaci opět reaktivován a při pH 3,0 získá 79 ± 11 % své původní aktivity (Johnston 2007).

Tab. 2.3 Negativní působení pepsinu na buňky (Zeleník 2013)

Zvyšuje tkáňovou permeabilitu
Způsobuje buněčnou disrupci
Snižuje hladinu CA-III v buňkách (tím omezuje produkci bikarbonátu, který zvyšuje pH)
Snižuje produkci protektivních stresových proteinů Sep70 a Sep53
Poškozuje mitochondrie a Golgiho systém
Zvyšuje expresi receptorů a cytokinů zánětlivé reakce (CCL20, CCL26, IL8, IL1F10, IL1A, IL5, BCL6, CCR6, CXCL14)

Přesné určení skutečné prevalence LPR je i přes rychlý rozvoj nových diagnostických metod velmi obtížné. Problémem je, že se jedná o vysoce nehomogenní skupinu pacientů, závažnost jednotlivých příznaků výrazně kolísá a větší část pacientů s LPR nemá typické příznaky refluxní choroby jícnu. Neexistuje tedy zcela typický příznak pro LPR. Není proto možné přesnou prevalenci onemocnění určit například pomocí dotazníků (Formánek 2016, Zeleník 2013). Vyšetřovací možnosti LPR budou blíže probrány v následující kapitole (viz 2.2.6). V každém případě se ale jedná o patologii, která postihuje významnou část populace a u které je dobře znám její podíl na mnohých onemocněních sliznic horních dýchacích a polykacích cest, např. na chronické hypertrofické refluxní laryngitidě. Autor práce se mimo jiné podrobněji zabýval průkazem vlivu LRP na chronickou rinosinustitidu, chronický sekretorický středoušní zánět u dětí a dentici (Formánek 2015, Hránková 2022, Javorská 2023, Zeleník 2015 a 2022).

Podíl LPR na vzniku prekanceróz a karcinomu hrtanu je stále zkoumán. Přesné určení tohoto vlivu je obtížné z důvodu velmi časté přítomnosti známých rizikových faktorů (kouření, alkohol) a nejednotnosti diagnostických metod a kritérií používaných v diagnostice LPR. Mnoho studií také od sebe neodlišuje LPR od pouhé refluxní nemoci jícnu. Výsledky jednotlivých studií se nejen proto významně liší. Zdá se, že LPR je u prekanceróz a karcinomu hrtanu sledován obecně častěji, a to i v případě, že je zohledněn vliv kouření a požívání alkoholu (Parsel 2020, Zhang 2014). Je ale obtížné odlišit, zda je LPR skutečnou příčinou, vedlejším nálezem nebo až následkem změn vyvolaných prekancerózou či karcinomem.

Sliznice hrtanu, na rozdíl od sliznice jícnu, postrádá schopnost produkovat bikarbonát, a je tak mnohem více náchylná k chemickému poškození (Lechien 2017). V případě LRP je hlavním poškozujícím faktorem pepsin (Koufman 1991; tab 2.3). Není však dosud jednoznačně prokázáno, zda LPR dokáže způsobit samotnou tumorogenezi. Na druhou stranu tato jeho schopnost již byla prokázána v případě karcinomu jícnu (Lagergren 2000, Samuels 2019, Souza

2016). Johnston et al. také u hypofaryngeálního karcinomu popsal, že pepsin signifikantně mění expresi 27 genů zapojených v kancerogenezi a ovlivňuje expresi 22 microRNA, u kterých je známo, že jsou u karcinomů hlavy a krku změněny. Pepsin dále akcentoval proliferaci, a to i u zdravých buněk epitelu hrtanu *in vitro* (Johnston 2012). Akcentace proliferace, migrace a sekrece interleukinu (IL) 8 způsobená pepsinem byla sledována *in vitro* také u dvou buněčných linií (Hep-2 a Tu212) karcinomu hrtanu. Se zvyšující se koncentrací pepsinu pak byla sledována změna morfologie buněk, snížení hladiny E-cadherinu a zvýšení mezenchymálních markerů ukazujících na epitelo-mezenchymální tranzici (vimentin a β -catenin). Po inhibici pepsinu pepstatinem došlo ke snížení sekrece IL8 a návratu tranzice. Signifikantní efekt na snížení proliferace, migrace a omezení tranzice měl také inhibitor IL8 (Tan 2019). Obdobný efekt pepsinu byl sledován také u hypofaryngeálního karcinomu a subglotické stenózy (Kelly 2014, McCann 2020, Niu 2020). Svou roli by mohla hrát rovněž H⁺/K⁺ ATPáza (vodíko-draselná pumpa), jejíž přítomnost byla prokázána také v sliznici hrtanu a častěji v buňkách karcinomu hrtanu (Bao 2020). Ta by mohla lokálně acidifikovat prostředí a reaktivovat takto dříve absorbovaný pepsin se všemi navazujícími důsledky. Tohoto procesu by se mohl účastnit GLUT 1 (přenašeč glukózy), jehož postupně se signifikantně zvyšující exprese se závažností léze byla sledována v leukoplakiích hlasivek a karcinomu hrtanu (Ao 2022).

Na druhou stranu ve studii Filha et al., která zkoumala 32 pacientů s leukoplakií hlasivek, byly znaky LPR obecně spojeny s nižší expresí cathepsinu B (proteolýza) v dysplaziích hlasivek ve srovnání s kouřením a abusem alkoholu. Vysoká hodnota cathepsinu B a kouření byly naopak častěji spojeny s recidivou onemocnění (Filho 2021). Dále pak ve studii Cuia et al., které retrospektivně hodnotila 555 leukoplakií hlasivek, z čehož 233 představovalo prekancerózu nebo karcinom, nebyl LPR prokázán častěji než u benigních lézích. Jeho prevalence byla ale obecně velmi vysoká, dosahující až 78 % (Cui 2017).

2.2 Vyšetřovací metody hrtanu

Nejčastější obtíže v oblasti hrtanu, které přivedou pacienta k vyšetření, jsou problémy s hlasem (chrapot, hlasová únava), pocit ztíženého nádechu (dušnosti), kašel a bolesti v krku. Podrobnější obraz o nemoci hrtanu dostáváme anamnestickými dotazy a pečlivým rozborem příznaků onemocnění. Diagnóza je zpravidla stanovena vizuálním vyšetřením hrtanu. Kvalitu hlasu lze posoudit speciálními vyšetřovacími metodami (Formánek 2022, Zeleník 2022).

2.2.1 Anamnéza a příznaky

Základem každého diagnostického procesu je odebrání anamnézy. Nesmí být vynechán údaj o nikotinismu pacienta a okolí, důležitý je kvantitativní údaj. Prekancerózy a karcinom hrtanu se nejčastěji projevují změnou charakteru hlasu (chrapotem), bolestí v krku, ztíženým polykáním, kašlem a ztíženým dýcháním. Pro potřeby práce jsou dále uvedeny jen specifické otázky kladené při podezření na onemocnění spojené s infekcí HPV, která přichází do úvahy v případě RRP (tab. 2.4, Formánek 2022).

Tab. 2.4 Specifické otázky při podezření na onemocnění spojené s infekcí HPV

- přítomnost imunodeficiency u vyšetřované osoby i v rodině;
- aktivní i pasivní kouření;
- pracovní anamnéza se zaměřením na hlasovou profesionalitu;
- v případě chrapotu také na jeho subjektivní vnímání;
- u dětí na okolnosti porodu (vaginální versus císařský řez, věk matky při porodu) a na to, zda se jedná o prvorozené dítě;
- u dětí na přítomnost kondylomat u rodičů (v minulosti i nyní) a přítomnost projevů HPV infekce u sourozenců;
- historii očkování proti HPV (v případě dítěte také u rodičů a sourozenců);
- historii adjuvantní terapie v případě RRP;
- počet chirurgických výkonů a operační techniku, kterou byly provedeny.

2.2.2 Vizuální vyšetřovací metody

2.2.2.1 Ambulantní vyšetření

Základním vizuálním vyšetřením hrtanu je laryngoskopie, která slouží především k posouzení morfologie a hybnosti hrtanu.

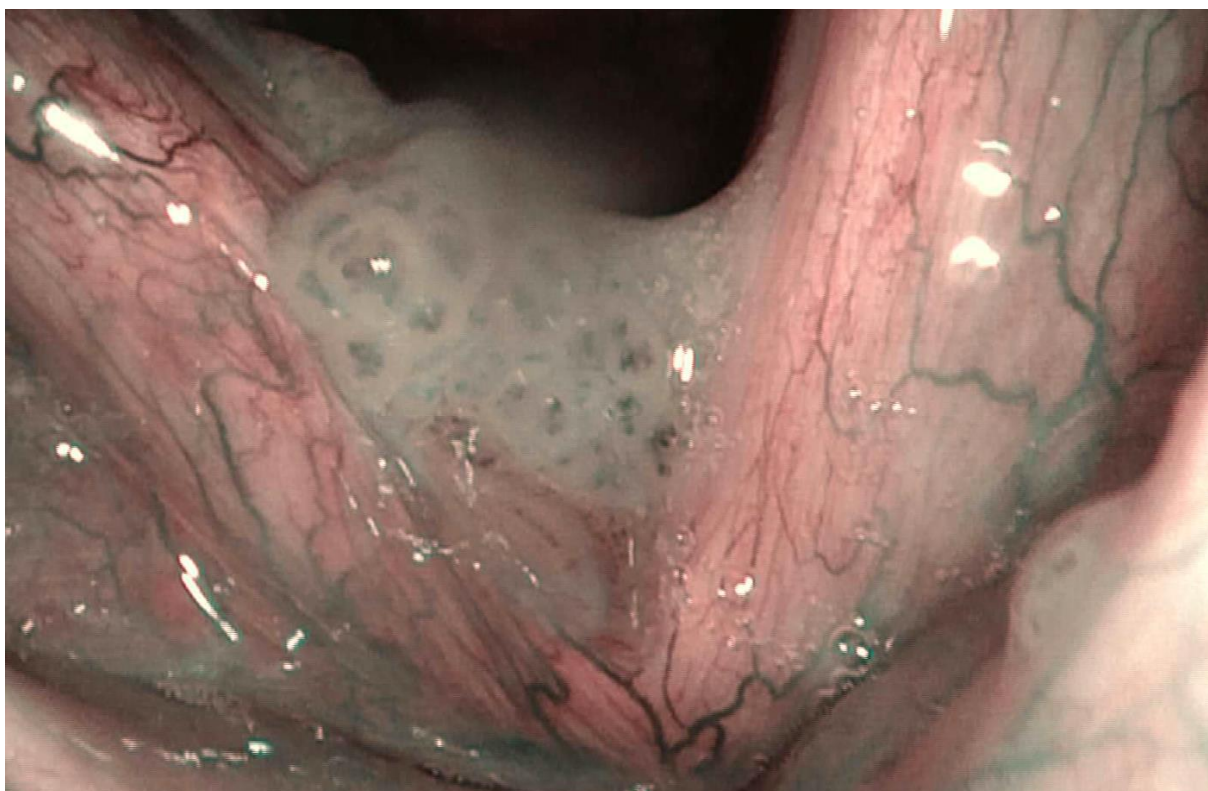
- *Nepřímá laryngoskopie laryngoskopickým zrcátkem* umožní základní hodnocení morfologie a pohyblivosti hrtanu, je ovšem méně detailní. Hlavní výhodou je jednoduchost a dostupnost vyšetření.
- *Zvětšovací laryngoskopie* umožňuje zvětšený pohled do hrtanu optikou se 70° nebo 90° úhlem vidění. Umožňuje detailní hodnocení jednotlivých oblastí hrtanu, hodnocení povrchu a pohybu hlasivek a orientační hodnocení jejich kmitání. Vyšetření obecně probíhá buď bez

použití videořetězce (vyšetřující se dívá do okuláru), nebo s nasazenou endoskopickou kamerou na okuláru endoskopu a obraz je poté pozorován na monitoru. Výhodou vyšetření je, že lze provést i videozáznam.

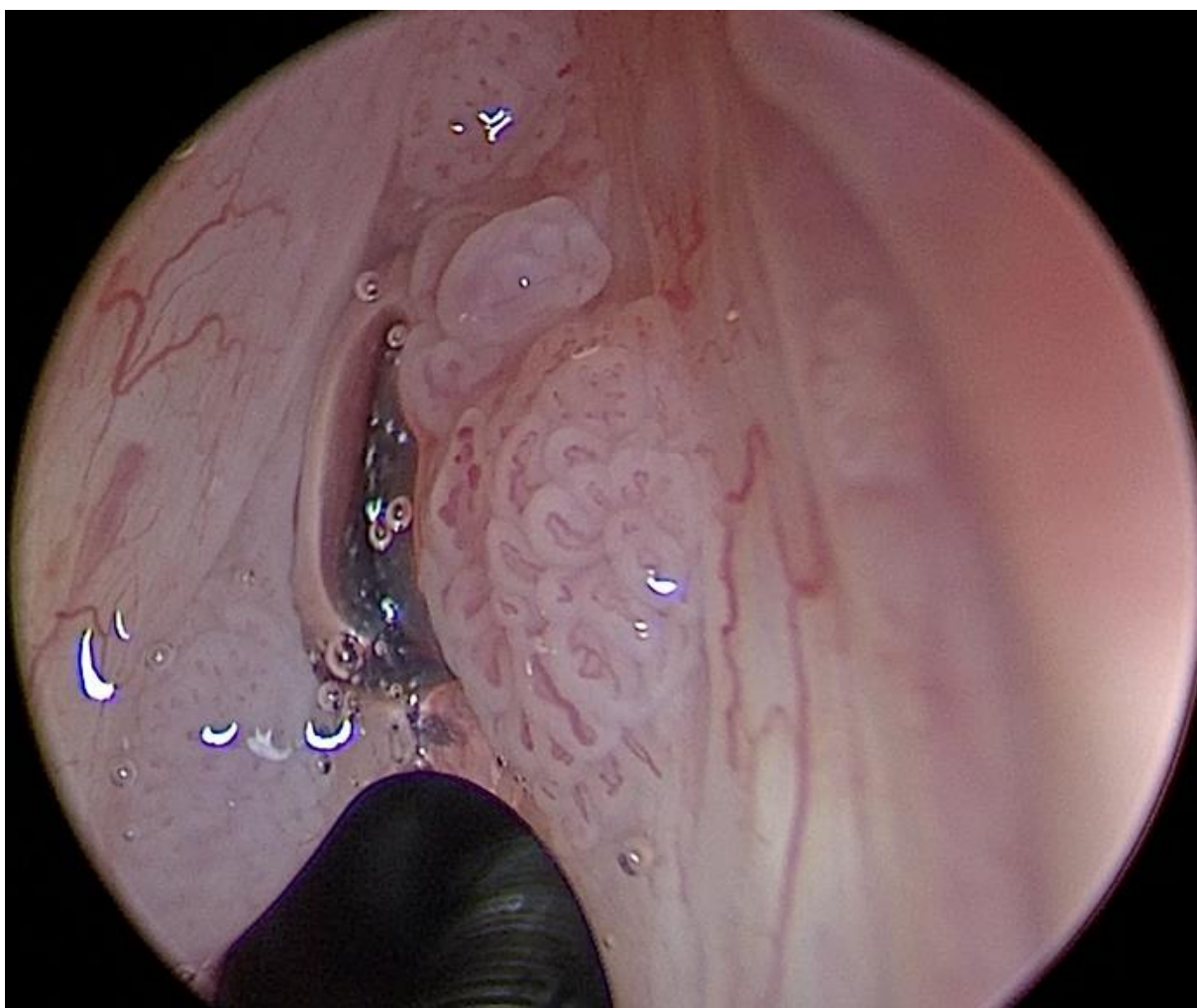
- *Flexibilní laryngoskopie* umožňuje vyšetření hrtanu za přirozenějších podmínek (dávivý reflex je omezen zavedením endoskopu transnazálně) a ze vzdálenosti jen několika milimetrů. Díky tomu je dosahováno výrazného zvětšení obrazu a zobrazení mnoha detailů.
 - *Fibroskop* je přístroj, ve kterém je obraz ohebnou částí veden pomocí optických vláken a je poté pozorovatelný pouhým okem přiloženým k okuláru. Takový obraz je zatížen artefakty – černou mozaikou, která je způsobena mrtvými prostory mezi jednotlivými optickými vlákny.
 - *Videoendoskopy* poskytují nejkvalitnější zobrazení. V distální části jsou vybavené digitálním čipem, který zachycuje obraz, který je dále veden tělem endoskopu již jako elektrický signál dále zpracovaný kamerovou jednotkou a zobrazený na monitoru. Díky absenci optických vláken není oproti fibroskopům výsledný obraz zatížen artefakty.
- *Optické videoendoskopické zobrazovací metody využívající filtrovaného světla nebo softwarovou úpravu obrazu*
 - *Narrow Band Imaging (NBI)* (firma Olympus) je metoda, která využívá charakteristik světelného spektra ke zlepšení zobrazení povrchu sliznice, povrchových slizničních a podslizničních cév. Zobrazuje změny v kvalitě epitelu a změny ve slizniční vaskularizaci (obr. 2.1). To je důležité při zobrazování slizničních lézí, které vykazují změny ve vaskularizaci, jako je například papilomatóza. Vyšetření je neinvazivní, v ambulantním režimu se využívá nejvíce pomocí flexibilních videoendoskopů, kdy jej lze provádět bez nutnosti sedace pacienta, často i bez nutnosti užití lokálního anestetika.
 - *Autofluorescence* byla použita k diagnostice hrtanových lézí poprvé v 90. letech minulého století. Ve sliznici hrtanu se běžně nacházejí porfyriny, elastin, kolagen a nikotinamid adenin dinukleotid. Tyto molekuly mají schopnost fotoluminiscenčního záření, tzv. autofluorescence a jsou nazývány fluorofory. Umožňuje lepší detekci drobných lézí, které nemusí být patrné v bílém světle, zároveň také umožňuje přesné určení rozsahu léze. Autofluorescence neumožňuje přesnější rozlišení charakteru léze ve smyslu odlišení benigních od maligních nálezů.

- *IMAGE1 S* (firma K. Storz) je metoda artificiálně zlepšující kontrast endoskopického obrazu sliznice, která je osvětlována kompletním bílým světlem a je obrazovým procesorem digitálně přebarvena, a tím je docíleno výsledného obrazu, který kontrastně zvýrazní cévní struktury vůči okolnímu epitelu (obr. 2.2). Je možno volit z několika režimů zobrazení. V případě flexibilní videoendoskopie je vyšetření limitováno dosaženým zvětšením a rozlišením. Zobrazení je proto také využíváno v kombinaci se zvětšovací nebo kontaktní endoskopií v celkové anestézii.

Obr. 2.1 Obraz recidivující respirační papilomatózy postihující obě hlasivky při flexibilní videoendoskopii s NBI. Je zvýrazněna typická cévní kresba papilomů, kdy v každé epitelové papile probíhá vlnitá centrální kapilára (Formánek 2022).



Obr. 2.2 Obraz recidivující respirační papilomatózy postihující obě hlasivky při zvětšovací videoendoskopii s IMAGE1 S. Je zvýrazněna typická cévní kresba papilomů, kdy v každé epitelové papile probíhá vlnitá centrální kapilára (Formánek 2022).



- *Laryngostroboskopie* je optická vyšetřovací metoda hrtanu umožňující detailní posouzení pravidelnosti a amplitudy kmitání hlasivek, jejich fázového posunu a kompletnosti uzávěru. Veličiny, které jsou běžným okem nepozorovatelné, a tedy nehodnotitelné. Posouzení kmitání hlasivek je umožněno díky optickému klamu „zpomalení“ pohybu hlasivek. Provedení je shodné jako u laryngoskopie. Stroboskop může být součástí flexibilní nebo rigidní endoskopie. V průběhu vyšetření pacient fonuje v různých frekvencích, modulacích a intenzitách. Hodnocením kmitání hlasivek jsme schopni mimo jiné určit, zda patologie zasahuje do hlubších vrstev hlasivky, což ukazuje na maligní charakter.
- *Videokymografie* umožňuje přímé vyšetření kmitavého pohybu hlasivek. Princip je založen na vysokorychlostním snímání pohybů hlasivek. Kamera snímá zvolenou oblast (řádek) hlasivek rychlostí až 8 tisíc snímků za sekundu, výsledné snímky klade pod sebe, a tak

vytváří grafický záznam (kymogram) zobrazující kmitání hlasivek ve zvoleném místě. Vyšetření umožňuje podrobné hodnocení pravidelnosti a symetrie kmitů, jejich fázového posunu a synchronicity. Zakulacení a zašpičatění vrcholů kmitů napovídá o poddajnosti sliznice a vertikální tloušťce hlasivek. Ve srovnání se stroboskopií nabízí lepší možnosti analyzování a kvantifikování. Na druhou stranu je možné vyšetřit pouze jedno zvolené úzké místo hlasivek, a ne hlasivku jako celek.

2.2.2.2 Operační vyšetření

Přímá (direktní) laryngoskopie je operační technika vyšetření. Provádí se v celkové anestézii. Vedle diagnostického cíle umožňuje i terapeutický zásah na hrtanu. Bývá doplňována o mikroskopii a užití úhlových rigidních endoskopů (standardně 0°, 30° a 70°), a to v kombinaci s endoskopickými zobrazovacími metodami zmiňovanými výše. Vyšetření pomocí NBI nebo IMAGE1 S systémů umožňuje využít i tzv. zvětšovací endoskopii a kontaktní endoskopii.

- *Zvětšovací endoskopie s NBI nebo IMAGE1 S* poskytuje výrazně lepší zobrazení, než standardní (nezvětšovací) endoskopy. Díky tomu mohou být detailněji zobrazeny změny ve vaskularizaci. Užívány jsou optické rigidní endoskopy pro direktní laryngoskopie a vyšetření je prováděno z minimální dosažitelné vzdálenosti, která je většinou menší než 1 mm. Dosahováno je až 150násobného zvětšení (při využití 24palcového monitoru), a tím detailního zobrazení slizniční kapilární mikroarchitektury *in vivo*.
- *Kontaktní endoskopie s NBI nebo IMAGE1 S* je optická endoskopická zobrazovací metoda, která umožňuje pozorovat sliznici *in vivo* s rozlišením na buněčné úrovni. Využívány jsou speciální rigidní endoskopy vybavené ostřicí mechanismem, který poskytuje zvětšený obraz po přiložení přímo na povrch sliznice. Dosahované zvětšení je při použití endoskopické kamery a 24palcového monitoru až 1100násobné. Dle stupně změn mikrovaskularizace lze odlišit léze charakteru papilomů, hyperplazie, dysplazie, karcinomu *in situ* či invazivního karcinomu.

Nevýhodou přímé laryngoskopie je kromě celkové anestézie i nemožnost posoudit pohyblivost a kmitání hlasivek.

2.2.2.3 Hodnocení cévní architektiky u videoendoskopických metod využívajících využívající filtrovaného světla nebo softwarovou úpravu obrazu

První klasifikací epiteliální vaskularizace pro hodnocení patologických změn v oblasti hrtanu byla klasifikace dle Ni (2011). Jedná se o modifikaci klasifikace dle Inoue využívané při hodnocení cévní architektiky sliznice jícnu (Inoue 2001). Charakter změn kapilárních klíček v slizničním epitelu ve videoendoskopickém obraze je rozdělen do 5 typů od fyziologického vzhledu (typ I) až po změny vaskularizace typické pro nádorové změny (typ V). Typ V je dále rozdělen do třech podskupin (tab. 2.5). Při vzniku klasifikace bylo vycházeno z videoendoskopie s NBI.

Tab. 2.5 Klasifikace epiteliální vaskularizace pro hodnocení patologických změn v oblasti hrtanu (Ni 2011).

Typ	Popis vaskulárních změn	
I	tenké, šikmé, rozvětvené, propojené klíčky	
II	rozšířené klíčky	
III	část větvení klíček kryto bílou sliznicí	
IV	jemné tečkovité klíčky	
V	a	intraepiteliální kapilární klíčky jako výrazné hnědavé skvrny
	b	klíčky nepravidelné, klikaté, hadovité
	c	hnědavé nepravidelné skvrny roztroušené na povrchu tumoru

Klasifikace dle Arense (2016) je výsledkem konsenzu Evropské laryngologické společnosti. Ve srovnání s předchozí klasifikací podle Ni et al. (2011) je jednodušší a dominuje v ní popisné hodnocení změn. Arensova klasifikace rozlišuje kromě fyziologické cévní kresby pouze dva typy cévních změn, a to longitudinální a perpendikulární.

- *Longitudinální vaskulární změny* – průběh i větvení cév je v rovině, cévy mohou být ektatické, dilatované, jejich průběh bývá meandrovitý až vřetenovitý. Mohou být přítomny i konvoluty drobnějších kapilár. Zvýšení počtu a hustoty cév je spojeno s dalším větvením cév a anastomózami mezi nimi.
- *Perpendikulární vaskulární změny* – průběh a větvení cév je v prostoru, vytvářejí skutečné klíčky, mohou mít vřetenovitý nebo spirálovitý tvar, případně bizarní průběh s červovitým vzhledem. Pro karcinomy jsou typické symetricky uspořádané smyčky vzhledu teček

s ostrým úhlem zakřivení pod průsvitným epitelem vyrůstající z hlubších vrstev hlasivky. V procesu karcinogeneze cévní kličky dostávají více spirálovitý tvar.

2.2.3 Histologická diagnostika

Definitivní diagnóza je vždy stanovena až histopatologickým vyšetřením odebraného vzorku. V případě RRP je mikroskopicky dlaždicobuněčný papilom tvořen fibrovaskulárními papilami, které jsou kryty dlaždicobuněčným epitelem, často s rozšířením zóny parabazálních buněk. Koilocyty jako morfologická známka produktivní HPV infekce jsou patrné v povrchových vrstvách epitelu.

Makroskopický vzhled laryngeální epiteliální dysplazie je velmi variabilní a nekoreluje s mikroskopicky zjištěným stupněm případných dysplastických změn dlaždicobuněčného epitelu. Klasifikace dysplazie není stále zcela uspokojivě vyřešena, což nejlépe dokládá skutečnost, že existuje několik paralelně používaných klasifikačních schémat, která jsou většinou založena na dvoustupňovém, resp. třístupňovém hodnocení tíže dysplastických změn dlaždicobuněčného epitelu (tab. 2.6). Určujícím rozdílem mezi low grade dysplazií a high grade dysplazií je rozsah architektonických a cytologických abnormalit dlaždicobuněčného epitelu. Zatímco u low grade dysplazie jsou tyto abnormality omezeny na dolní polovinu epitelu, u high grade dysplazie je ve variabilním rozsahu postižena také horní vrstva epitelu. V případě karcinomu in situ je epitel abnormální v celé své tloušťce (WHO 2022).

Tab. 2.6 Laryngeální epiteliální dysplazie – základní klasifikace (WHO 2022)

Klinický význam	Rozsah abnormalit epitelu	Třístupňový hodnotící systém	Dvoustupňový hodnotící systém
Nízce riziková léze	Dolní polovina	Low grade dysplazie	Low grade dysplazie
Vysoce riziková léze	Více než dolní polovina	High grade dysplazie	High grade dysplazie
	Celá tloušťka	Karcinom in situ	

Diagnostika je v současné době stále ještě založena na pečlivém zhodnocení léze v klasickém barvení hematoxylinem a eozinem; imunohistochemické markery (např. p53, Ki-67, p16, EGFR, cytokeratin 19, MAGE-A) mají zatím pouze podpůrný význam a jejich použití pro vlastní klasifikaci dysplazií není doporučováno (Hellquist 2020). Dysplastický dlaždicobuněčný epitel bývá většinou v různé míře ztlustělý, může však být i normální

tloušťky, popř. atrofický. Na povrchu epitelu může být přítomno rohovění v podobě ortokeratózy nebo parakeratózy. U high grade dysplazie lze podle přítomnosti či absence maturace epitelu ještě rozlišit bazaloidní podtyp (bez maturace) a velkobuněčný/ spinózní podtyp (s maturací). V subepiteliální vazivové tkáni bývá různě intenzivní zánětlivý infiltrát. Velmi důležitým znakem low grade i high grade dysplazie je intaktní bazální membrána dlaždicobuněčného epitelu, čímž se tyto léze odlišují od invazivního dlaždicobuněčného karcinomu. Rovněž desmoplastická reakce, poměrně typická pro invazivní dlaždicobuněčný karcinom, u přednádorových lézí chybí (WHO 2022).

2.2.4 Diagnostika lidských papilomavirů

K rozšířené diagnostice přednádorových a nádorových onemocnění hrtanu patří v současnosti jednoznačně také průkaz přítomnosti HPV. Diagnostika HPV je ve většině případů založena na přímém průkazu viru. Díky detailní znalosti sekvence HPV byla vyvinuta celá řada molekulárně biologických testů, které umožňují nejen detekci viru, ale také určení konkrétního typu HPV. Přímý průkaz se provádí detekcí virové DNA/ RNA amplifikačními (polymerázová řetězová reakce; PCR) či neamplifikačními metodami, přičemž některé amplifikační metody mohou určit i virovou nálož (např. kvantitativní PCR v reálném čase) (Formánek 2022).

K nepřímému průkazu viru jsou řazeny imunohistochemický průkaz exprese nádorového supresorového proteinu p16 a detekce HPV-specifických protilátek (Formánek 2022).

Testy se liší řadou parametrů, klinickou a analytickou citlivostí, specificitou a spektrem typů, které jsou schopné detekovat (tab. 2.7). Jejich bližší popis přesahuje možnosti této práce.

Tab. 2.7 Citlivost a specifita nejčastěji používaných metod detekce HPV (Formánek 2022).

Klinický materiál	Metoda	Citlivost	Specifita	Citace
Fixovaná tkáň	Imunohistochemie (p16)	94 %	83 %	Prigge 2017
	In situ hybridizace DNA	65 %	94 %	Kerr 2015, Schache 2013
	In situ hybridizace RNA	91–97 %	93–94 %	Kerr 2015
	PCR DNA	98 %	84 %	Prigge 2017
Nefixovaná tkáň	PCR DNA	99 %	98,6 %	Qureishi 2018
	PCR RNA E6 a E7	100 %	100 %	Rotnáglová 2011
Krev/ sérum	Protilátky proti HPV 16 E6 a E7	89 %	96–98 %	Rotnáglová 2011
	Protilátky proti HPV 16 E6	96 %	98 %	Holzinger 2017

2.2.5 Diagnostika laryngofaryngeálního refluxu

Typickými příznaky laryngofaryngeálního refluxu (LPR) jsou zahlenění, chraptot, pocit cizího tělesa v krku, pokašlávání a chronický kašel. Obtíže pacientů s LPR trvají zpravidla dlouho dobu (měsíce až léta). K odebrání anamnézy lze využít dotazník Reflux symptom index, který má přesnější diagnostickou hodnotu než jednotlivé symptomy (tab. 2.8). Při jeho vyplňování má pacient za úkol k jednotlivým problémům přiřadit číslo 0 až 5 podle toho, jak moc jej jednotlivé problémy obtěžovaly v posledních měsících. Pokud je celkový součet bodového ohodnocení jednotlivých položek větší než 13, je velká pravděpodobnost, že jeho obtíže jsou způsobeny LPR (Belafsky 2002, Zeleník 2013). Nevýhodou dotazníku je, že vysoké skóre v něm vykazují pacienti v akutním stádiu respiračního infektu, kuřáci, pacienti po radioterapii a neurotičtí pacienti. Další nevýhodou je jeho hlavní zaměření na problémy týkající se hrtanu. Nejsou v něm tedy obsaženy další příznaky a nemoci, které může patologický LPR způsobovat.

Tab. 2.8 Dotazník Reflux symptom index (Zeleník 2013).

Jak významně Vás obtěžovaly následující problémy v posledních měsících?	0 - bez obtíží 5 - závažné problémy					
	0	1	2	3	4	5
Chrapot nebo jiný problém s hlasem	0	1	2	3	4	5
Časté odkašlávání, nutnost odstranit hleny z krku	0	1	2	3	4	5
Nadměrná tvorba hlenů v krku a nosohltanu	0	1	2	3	4	5
Ztížené polykání jídel, nápojů nebo tablet	0	1	2	3	4	5
Kašel po jídle nebo ulehnutí	0	1	2	3	4	5
Obtěžující, těžko ovlivnitelný kašel	0	1	2	3	4	5
Pocit cizího tělesa (knedlíku) v krku	0	1	2	3	4	5
Pálení žáhy, bolest na hrudi, pocit plnosti či návrat potravy do dutiny ústní	0	1	2	3	4	5

Následuje vyšetření hrtanu s posouzením možných známek refluxní laryngitidy, jako nařasení, otok a zarudnutí zadní komisury, otok hlasivek, přítomnost granulomů, pseudosulcus vocalis (subglotický otok) a další. Belafsky se snažil hodnocení nálezů na sliznicích standardizovat a za tímto účelem vytvořil nástroj na hodnocení - tzv. Reflux finding score (tab. 2.9). Při endoskopickém vyšetření hrtanu je hodnoceno 8 vybraných patologií a jejich bodové ohodnocení odráží jejich závažnost. Pokud je celkové skóre větší než 7, je dle Belafského 95 % jistota, že nález v hrtanu je způsoben LPR (Belafsky 2001). Následující studie ovšem takto vysoko udávanou jistotu nepotvrdily.

Tab. 2.9 Reflux finding score (Zeleník 2013).

Hodnocený nález	Bodové ohodnocení
Subglotický otok (pseudosulcus)	0 - nepřítomen, 2 - přítomen
Obliterace Morganského ventrikulu	0 - není, 2 - částečná, 4 - úplná
Erytém/hyperémie	0 - není, 2 - pouze arytenoidní hrboly, 4 - difúzní
Otok hlasivek	0 - není, 1 - mírný, 2 - střední, 3 - těžký, 4 - polypoidní
Difúzní otok hrtanu	0 - není, 1 - mírný, 2 - střední, 3 - těžký, 4 - obturující
Hypertrofie zadní komisury	0 - není, 1 - mírná, 2 - střední, 3 - těžká, 4 - obturující
Granulom/granulace hrtanu	0 - nepřítomny, 2 - přítomny
Hustý hlen v hrtanu	0 - nepřítomen, 2 - přítomen

Jako další krok v diagnostice LPR je nejčastěji doporučován diagnosticko-terapeutický test pomocí inhibitorů protonové pumpy. Pro diagnostiku LPR je však odlišný v porovnání s testem používaným gastroenterology. Dávka je vyšší (2x denně) a délka trvání má být minimálně 3–6 měsíců. Důvodem je, že zhojení mimojícnových tkání trvá mnohem déle než zhojení sliznice jícnu (Vaezi 2006). Samotný výsledek testu je obtížné hodnotit. Doba 6 měsíců je poměrně dlouhá a je velmi pravděpodobné, že pokud měly obtíže jinou příčinu než LPR (např. alergii nebo infekci), může za tuto dobu dojít k jejímu vymizení nezávisle na terapii inhibitory protonové pumpy. Výsledek může v tom případě být hodnocen jako falešně pozitivní (Belafsky 2006). Obdobně komplikovaná situace také nastává, pokud po testu nedojde k vymizení symptomů. V této situaci není jisté, zda je důvodem to, že obtíže nejsou způsobeny LPR nebo špatná compliance nebo nízká dávka léků (Belafsky 2006, Numans 2004, Zeleník 2013).

Nejpřesněji lze představu o epizodách LPR získat 24hodinovou monitorací jícnové impedance s pH-metrií a umístěním proximálního senzoru nad úroveň horního jícnového svěrače (Hoppp 2012). Jednakanálová pH-metrie se senzorem umístěným 5 cm nad úroveň dolního jícnového svěrače (prováděná gastroenterology) je pro diagnostiku LPR nevhodná, protože neposkytuje informaci o tom, zda se refluxát dostává mimo jícen (nad úroveň horního jícnového svěrače). V posledních letech je zvažováno k diagnostice LPR také použití 24hodinové měření orofaryngeálního pH a vyšetření pepsinogenu/ pepsinu v sekretech a tkáních (Formánek 2015, Jiang 2011). Přínosnost těchto metod však nebyla zatím dostatečně ověřena.

2.2.6 Vyšetření hlasu

Kvalitu hlasu je možné hodnotit pomocí různých metod. Je možné je rozdělit na subjektivní a objektivní.

- *Subjektivní hodnocení hlasu*
 - Hodnocení pacientem – pro posuzování kvality hlasu je důležitý subjektivní názor nemocného na vlastní kvalitu hlasu. K subjektivnímu hodnocení kvality hlasu používáme standardizovaný dotazník Voice Handicap Index v českém překladu, který obsahuje 30 otázek (Švec 2009). Vyplnění dotazníku v plném znění může být nepříjemné časovou náročností. Existuje proto tzv. zkrácená verze dotazníku, která obsahuje pouze 10 vybraných otázek (tab. 2.10).
 - Hodnocení vyšetřujícím (percepce) – medicínské subjektivní vyšetření hlasu hodnotí běžnou konverzační mluvu. Hodnocen je nejčastěji podle škály GRBAS

(stupeň, drsnost, dyšnost, slabost, napětí) dle Hirana (Hirano1981). Jinou možností je hodnotit hlas podle vizuálně-analogové škály.

Tab. 2.10 Voice Handicap Index-10, česká verze.

Otázka	0	1	2	3	4
P1. Stává se, že se mě lidé ptají, co to mám s hlasem.					
P2. Abych ze sebe vydal/a hlas, musím vynaložit úsilí.					
P3. Stává se, že dopředu nevím, jak můj hlas bude znít, když promluvím.					
F4. Stává se, že můj hlas lidé špatně slyší.					
F5. V hlučném prostředí mi lidé špatně rozumějí.					
F6. Potíže s hlasem mě omezují v osobním a společenském životě.					
F7. Kvůli potížím s hlasem se cítím vyloučen/a, když si ostatní povídají.					
F8. Mé potíže s hlasem mají nepříznivý dopad na mé výdělky.					
E9. Potíže s hlasem mi způsobují rozladění/ rozčílení/ nespokojenost.					
E10. Kvůli potížím s hlasem se cítím znevýhodněn/a, hendikepován/a.					

- *Objektivní hodnocení hlasu*

- Vyšetření hlasového pole mluvního hlasu přináší informace o frekvenčním a dynamickém rozsahu hlasu vyšetřovaného a zejména o umístění mluvního hlasu vzhledem ke hlasovému rozsahu. Platí zásada, že zdravý mluvní hlas je tvořen na dolním okraji frekvenčního hlasového spektra. K vyšetření hlasového pole se používá počítačový program a mikrofon.
- Kromě vyšetření hlasového rozsahu je možné pomocí počítačového programu a mikrofonu vyšetřit i nepravidelnosti hlasu. To znamená, není-li v hlase přítomno nepřiměřené množství tzv. neharmonických zvuků. Neharmonické zvuky nelze přesně frekvenčně specifikovat. Jsou charakteristické nepravidelným průběhem zvukové vlny. Označují se také termínem šramoty nebo šumy. Je-li příměs neharmonických tónů vyšší, nález svědčí pro poruchu hlasu.

- Maximální fonační čas je měřen několikrát po sobě (obvykle 3krát) při fonaci vokálu [a] ve vyšetřovanému příjemné a přirozené poloze a hlasitosti. Je u dospělých nejčastěji kolem 15 sekund, za patologický je považován čas kratší než 10 sekund (Hirano 1981). Nízký fonační čas detekuje neschopnost uzavření fonační štěrbiny na přiměřeně dlouhou dobu, a tudíž neschopnost vytvořit kvalitní základní frekvenci zvuku hlasu. Vyšetření je vhodné jako srovnávací metoda u jednoho vyšetřovaného, např. před a po chirurgickém zákroku nebo před a po hlasové terapii. Fonační kvocient hodnotí uzávěr glottis při fonaci pomocí výpočtu průměrné spotřeby vzduchu při fonaci. Vztahuje maximální fonační čas k vitální kapacitě plic.
- Index kvality hlasu se velmi dobře hodí pro klinická hodnocení hlasu. Hodnota je vypočítaná z akustických (hlasové pole, periodicita hlasu) a aerodynamických parametrů (fonační čas).

2.2.7 Vyšetření polykání

Nemoci hrtanu, zejména supraglotické a glotické oblasti mohou vést k dysfagii ve faryngeální fázi polykání, zejména aspiracím. Dotaz na polykací problémy a kašel při pití či jídle by proto měl být součástí vyšetření hrtanu. Anamnestické podezření na poruchu polykání lze ověřit některým z testů pro poruchy polykání. Charakter polykacích obtíží je možné upřesnit flexibilním endoskopickým vyšetřením polykání nebo videofluoroskopii.

2.3 Léčba

Léčba prekanceróz a karcinomu hrtanu může být rozdělena na nechirurgickou a chirurgickou.

2.3.1 Nechirurgická léčba

K nechirurgické léčbě onemocnění hrtanu je řazena hlasová terapie, režimová opatření a medikamentózní terapie.

- *Režimová opatření*

Režimová opatření jsou nedílnou součástí léčby mnohých hrtanových patologií. Ať už se jedná o dodržování hlasového klidu (nekřičet, nešeptat) např. po chirurgických operacích nebo antirefluxní režimová a dietní opatření, která jsou v případě LPR stejná jako u refluxní nemoci jícnu. Mezi základní obecná režimová doporučení pak patří vyvarování se cigaretovému kouři a alkoholu.

- *Medikamentózní terapie*

Medikamentózní terapie má své místo dominantně v léčbě zánětů hrtanu a RRP.

- Chronické záněty

Medikamentózní terapie je v případě chronických zánětů hrtanu využíváno dominantně u laryngitidy způsobené LPR, kde se kromě dietních omezení a režimových opatření využívají zejména inhibitory protonové pumpy, nejčastěji podávané dvakrát denně. Dále je využíváno prokinetik (např. itoprid-hydrochlorid).

- Recidivující respirační papilomatóza

Zvláštní kapitolou je adjuvantní (doplňková) léčba RRP. Souvisí s nemožností radikální resekce. Nabízí široké spektrum více či méně efektivních možností (Formánek 2022). Látky jsou podávány místně nebo systémově. V této oblasti probíhá intenzivní vývoj, který čerpá z výzkumu terapeutik užívaných v léčbě jiných nádorových onemocnění. Právě v oblasti adjuvantní léčby je v současnosti nejvíce neznámých. Není jednoznačná shoda na tom, kdy adjuvantní terapii indikovat. Obecně je ale doporučováno zvážit tuto terapii, když:

- pacient potřebuje více než čtyři operace ročně;
- papilomy způsobují respirační obtíže;
- papilomy se šíří distálně do průdušnice;
- pokud chirurgické metody nejsou možné.

Není ani jednoznačná shoda na tom, jaký preparát a jaké jeho podání zvolit (tab. 2.11). V současnosti je snaha tuto terapii, je-li indikována, co nejvíce individualizovat pomocí vyšetření genomu, genové exprese a somatického a germinálního exomu. Jedná se nicméně pořád o zcela výjimečné případy.

K adjuvantní terapii může být řazeno i očkování proti HPV. Indikace přichází do úvahy u rozsáhlejšího postižení těmi papilomy, které jsou úzce spjaté s jejich infekcí. Zatímco profylaktický účinek očkování je dobře znám, jeho terapeutický efekt nebyl zatím jednoznačně prokázán.

Tab. 2.11 Základní přehled látek používaných v adjuvantní terapii RRP (Formánek 2022)

	Látka	Způsob podání
Nejčastěji používané	cidofovir	intralezionálně, inhalačně, intravenózně
	bevacizumab	intralezionálně, intravenózně
	inosine pranobex	perorálně
	vakcína proti HPV	intramuskulárně
Málo používané	aciclovir	perorálně
	indol-3-karbinol	perorálně
	inhibitory protonové pumpy	perorálně
	pembrolizumab	intravenózně
	ultrafiltrovaný prasečí leukocytární extrakt	perorálně
Již nepoužívané	interferon α	intravenózně
	propranolol	perorálně
	vakcína proti příušnicím, spalničkám, zarděnkám a příušnicím	intramuskulárně

2.3.2 Chirurgická léčba

Chirurgická léčba prekanceróz a karcinomu hrtanu je zpravidla prováděna transorálně.

2.3.2.1 Obecné zásady mikrochirurgie hrtanu

Operace v oblasti hrtanu zaznamenaly v posledních letech významný vývoj. V současnosti by všechny operace v oblasti hrtanu měly být provedeny při mikroskopickém nebo endoskopickém zvětšení. Existují obecné zásady hrtanové mikrochirurgie. Jejich cílem je provést operaci co nejšetrněji, s co nejmenšími riziky pro pacienta a za co nejkratší dobu.

- *Fonochirurgický přístup*

U všech operací hrtanu by měl operatér provádět operaci tak, aby pooperačně byla zachována co nejlepší kvalita hlasu. Mezi obecné principy fonochirurgie patří zejména pravidlo říkající, že při odstraňování patologie hlasivky se snažíme nezasahovat ani do okolí patologie, ani do hlubších vrstev hlasivky. Zbytečná manipulace v místech, kde se již nenachází patologie, vede k riziku jizvení podslizniční lamina propria superficialis

a zhoršení hlasu. Ke zbytečné traumatizaci, zejména přední komisury, vede také příliš hluboké zasunutí přímého laryngoskopu při úvodní manipulaci a následné fixaci. Může zde dojít ke srůstu hlasivek. Chybou proto není ani operovat v této oblasti pro nemaligní diagnózu dvoudobě – tedy ošetřit nejprve jednu hlasivku a při další operaci případně druhou. Velmi opatrně je nutné postupovat v oblasti zadní komisury z důvodu rizika vzniku zadní glotické stenózy.

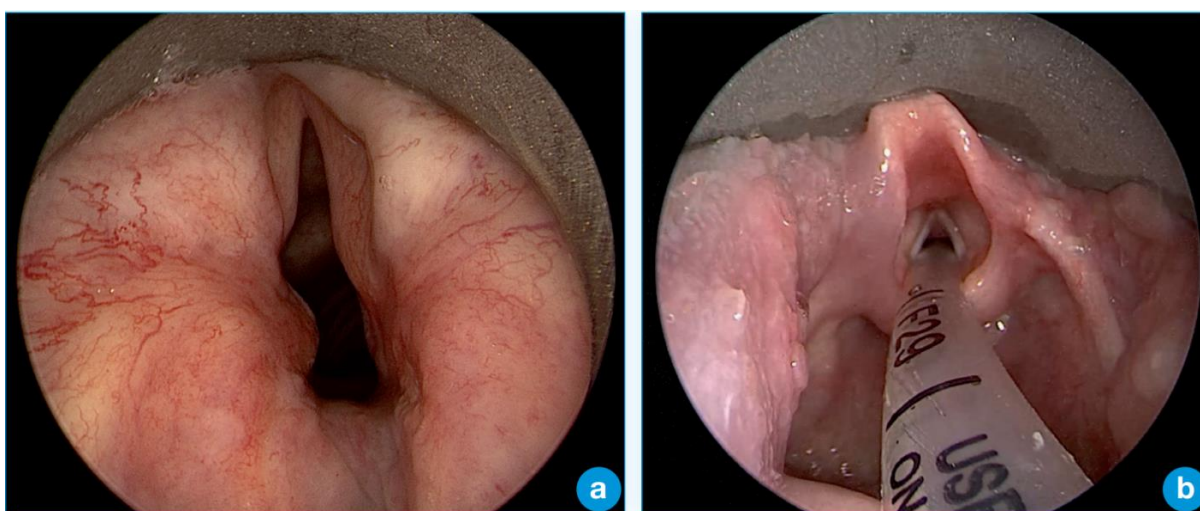
- *Správná velikost a tvar přímého laryngoskopu*

Příliš velký laryngoskop zbytečně traumatizuje supraglotis a vede k hematomům a otokům. Příliš malý laryngoskop zase zhoršuje přehlednost operačního pole a ztěžuje operatérovi manipulaci s nástroji. To může mít za následek chybný pohyb nástrojem a prodloužení doby trvání operace. Není chybou na začátku operace vyzkoušet několik laryngoskopů a vybrat ten nejvhodnější (obr. 2.3). Pro lepší expozici přední komisury lze využít tzv. „komisuroskop“, který je delší v předozadním rozměru. Pro operaci v oblasti epiglotis lze využít tzv. Benjaminův laryngoskop, kdy je přední okraj laryngoskopu zavedený do glosopiglotických vlekul (obr. 2.4). Zásadám přímé laryngoskopie se autor věnoval v oficiálním doporučení pro praxi odborné společnosti a v kapitole v knize (Formánek 2021 a 2022).

Obr. 2.3 Dospělý laryngoskop (a), laryngoskop pro expozici přední komisury hlasivek (b), distanční laryngoskop (Weerda) (c), Benjaminův laryngoskop (d) (Formánek 2021).



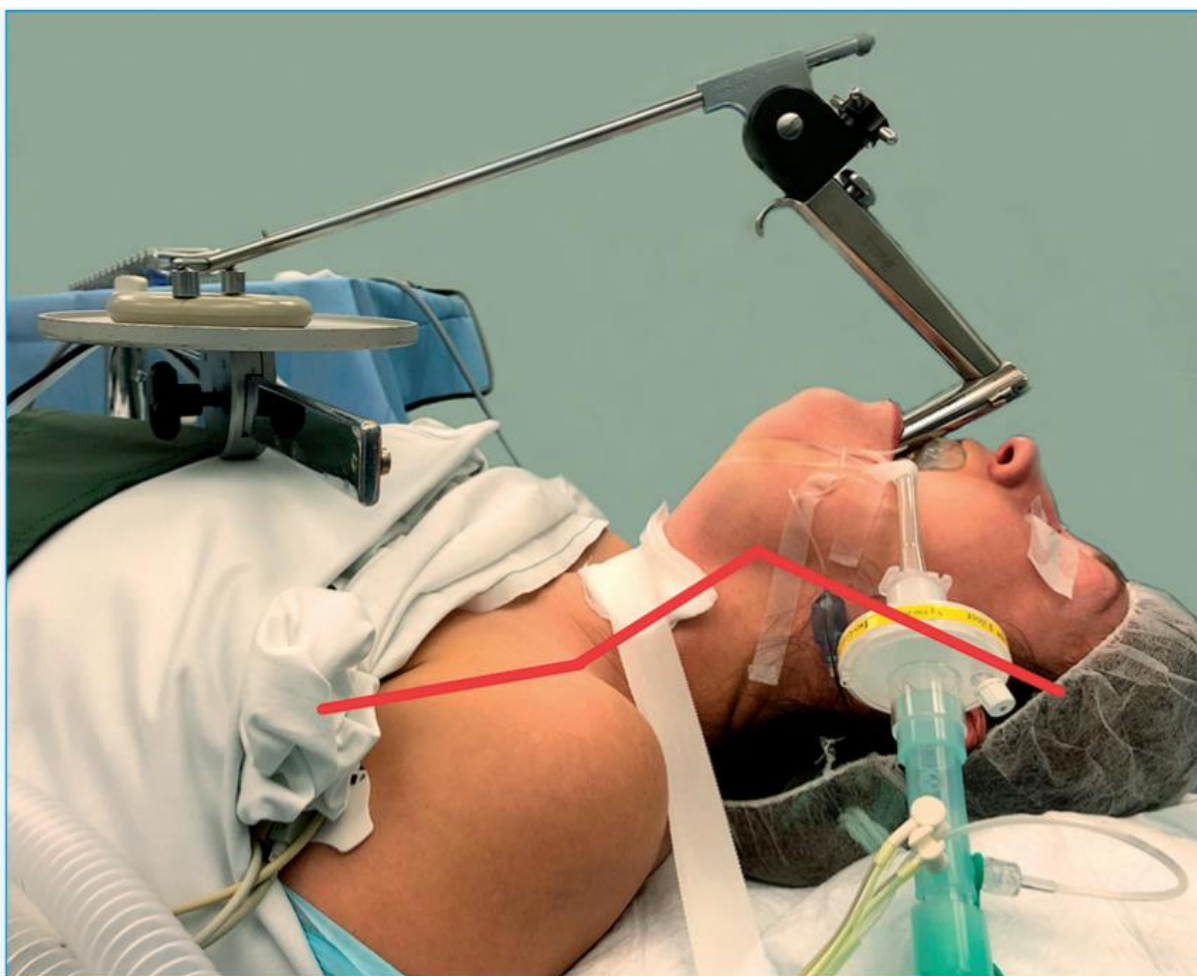
Obr. 2.4 Pohled do hrtanu přes standardní přímý laryngoskop (a) a přes Benjaminův laryngoskop (b) (Formánek 2021).



- *Kvalitní expozice hrtanu*

Zajištění kvalitní expozice hrtanu je zásadní. Je potřeba věnovat mu dostatek času a nespokojit se s nedostatečně přehledným hrtanem, což vede k mnohem obtížnější operaci a zvyšuje její rizika. Pokud není expozice přední komisury dostatečná, lze použít zatlačení na hrtan nebo jeho přitažení náplastí (obr. 2.5). Při nedostatečné expozici zadní komisury lze využít uvolnění fixace laryngoskopu, což vede k vytvoření lepšího úhlu pro přehlednost zadní komisury. Hrtan je důležité vždy na začátku operace podrobně prohlédnout, nejlépe endoskopem, a posoudit rozsah léze či vyloučit další patologie subgloticky.

Obr. 2.5 Přímá závěsná laryngoskopie, orotracheálně intubovaná pacientka uložena do „sniffing“ polohy. Trup a krk ve vzájemné flexi, krk a hlava v extenzi (červená linie). Zaveden laryngoskop a fixován na zevní fixátor. Pomocí tahu náplastí přes krytí na přední straně krku je zlepšena přehlednost přední komisury hrtanu (Formánek 2021).



- *Zásady použití laserů v hrtanu a průdušnici*
Při použití laserů v oblasti hrtanu je důležité dodržovat pravidla, která snižují nežádoucí účinek laseru na pacienta i zdravotnický personál (tab. 2.12).

Tab. 2.12 Pravidla pro používání laserů v chirurgii hrtanu.

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • používat intubační rourky určené k laserové chirurgii (speciální materiál, dva obturační balonky napuštěné fyziologickým roztokem); • na intubační rourku/ obturační balonky aplikovat proužky s fyziologickým roztokem; • při operaci udržovat frakci exspirovaného kyslíku do 30 %; • zalepit pacientovi oči a „obložit“ pacientův obličej vlhkými prostěradly; • připravit stříkačku s fyziologickým roztokem k okamžitému použití v případě vzplanutí dýchacích cest; • chránit oči personálu ochrannými brýlemi; • minimalizovat počet osob na operačním sále a upozornit osoby před vstupem na operační sál na používání laseru. |
|--|

2.3.2.2 Operační techniky využívané pro chirurgickou léčbu

V současnosti není žádná z technik (studené nástroje, laser, mikrodebridor, koblace) považována za významně lepší v porovnání s dalšími. Porovnání výsledků chirurgické léčby je obtížné z důvodů velmi heterogenních skupin pacientů. Jednotlivé techniky se často kombinují. Nejdůležitější se jeví zkušenost a „jemnost“ operátora při odstraňování papilomu.

- *Studená technika (chapáky, nůžky)* je nejdéle využívaná. Kromě toho, že je levná, je její výhodou to, že není produkováno teplo, které při průniku do hlubších vrstev může způsobit poškození tkání. Nevýhodou je, že je častěji odstraněna i okolní zdravá sliznice, a zbytečně tak dochází k jizvení větší části hlasivek.
- *CO₂ a KTP (draslík-titan-fosfát) laser* jsou při operacích v hrtanu využívány déle než 25 let. Výhody byly prezentovány řadou autorů (Dedo 2001, Karamzadeh 2004, Remacle 1999). Laser umožňuje přesnou vaporizaci slizničních lézí s minimálním krvácením a minimálním poškozením okolní sliznice a hlubších vrstev hlasivky. CO₂ laser musí být použit v nejšetrnějších režimech (krátké pulzy o malé energii) s širším nastavením paprsku (vaporizační mody), aby nedocházelo k průniku tepla do hlubších vrstev. Výhodou KTP laseru je fotoangiolytický efekt s popsáním lepším koagulačním efektem (Franco 2003). Kontrolované studie, které by porovnávaly výsledky KTP a jiných laserů zatím nebyly

provedeny (Lechien 2020). Při použití laserů je potřeba dodržovat všechny bezpečnostní postupy spojené s laserovou hrtanovou chirurgií (tab. 2.12).

- *Mikrodebridor (shaver)* začal být více využíván při operacích v hrtanu až v posledních 10 letech. Zejména v oblasti hlasivek musí být použit s velkou opatrností, aby nedošlo k poškození hlubších vrstev či dokonce k proniknutí mimo hrtan. Výhodný je zejména k odstranění periferních částí velkých papilomů (Carifi 2015, Gallagher 2008, Holler 2009).
- *Koblace* je v léčbě hrtanových lézí (zvláště papilomů) využívána v posledních 3–4 letech. Prezentovány byly zatím jenom krátkodobé výsledky u malého počtu pacientů (Awad 2019), výsledky se jeví podobné jako u jiných technik.

2.3.2.3 Komplikace chirurgické léčby

Ke komplikacím a dlouhodobým následkům jakékoliv formy chirurgické léčby hrtanu patří jizvení hlasivek se ztrátou jejich vibračních schopností, vznik synechie přední komisury, můstků a sulcus vocalis, zhoršení hybnosti hlasivek a vznik zadní glotické stenózy.

- *Jizvení hlasivek*

Nešetrné odstranění lézí vede k jizvení podslizničních tkání (zejména Reinkeho prostoru) a chrapotu. Tento stav (jizvy hlasivek, můstky, sulcus vocalis) nelze v současné době léčit a dysfonie vzniklá z tohoto důvodu je proto trvalá. Pokud se jednalo o „zbytečný“ peroperační zásah do hlubších vrstev hlasivky, lze mluvit o iatrogenním poškození hlasivek. Bylo prokázáno, že při použití zásad maximálního šetření tkání, mají i pacienti po mnoha operacích pro RRP poměrně dobrou kvalitu hlasu (Parker 2019).

- *Glottická a subglottická stenóza*

Mezi velmi závažné komplikace papilomatózy a zejména její chirurgické léčby patří glottická nebo subglottická stenóza. Ta může vést až k nutnosti provedení tracheotomie. V tomto případě lze provést některou z laryngotracheálních rekonstrukčních operací, například přerušení zadní části prstencové chrupavky s vložením chrupavky ze žebra (tzv. posterior split; Scatolini 2018).

- *Zkušenosti s operacemi snižují počet komplikací*

Přítomnost dlouhodobých následků po opakovaných operacích (jizvy hlasivek způsobující trvalý chrapot) byla zjištěna u pacientů s vyšším počtem provedených operací, u pacientů operovaných na pracovištích s menšími zkušenostmi a u pacientů, u kterých bylo nutné provést urgentní operační výkon (Scatolini 2020).

3 SOUHRN VLASTNÍCH VÝSLEDKŮ

Vlastní výzkum hrtanových prekanceróz a karcinomu jsme zacílili na několik oblastí. První oblastí je zlepšení diagnostiky. Podrobně jsme se zaměřili především na rozšíření diagnostiky RRP o identifikaci možných rizikových faktorů, které by mohly toto onemocnění spouštět nebo zhoršovat. Dále byl výzkum věnován využití nových optických metod k detekci hrtanových patologií a zpřesnění diagnostiky LPR ve smyslu určení, kdy je relevantní a skutečně ovlivňuje sliznici hrtanu, a ověření vhodnosti nových diagnostických metod LPR.

Druhá oblast je věnována léčbě prekanceróz a karcinomu hrtanu – převážně chirurgické, transorální, a to včetně jejích následků a komplikací.

Výsledkem našich výzkumných projektů je soubor publikací předkládaných a komentovaných v této části habilitační práce. V úvodu každé oblasti nebo případně podoblasti shrnujeme danou problematiku se zaměřením na objasnění vzniku jednotlivých studií. Následně jsou ve stručnosti představena nastavení jednotlivých studií a jejich výsledky. Podstatná zjištění jsou pak v nejzásadnějších bodech rekapitulována na závěr každé studie.

3.1 Diagnostika prekanceróz a karcinomu hrtanu

3.1.1 Výzkum rizikových faktorů recidivující respirační papilomatózy

K rozvoji RRP dojde pouze u velmi malého počtu nakažených osob HPV (viz 2.1.1). Existují proto snahy o identifikaci dalších možných faktorů, které by mohly u daného jedince HPV infekci potencovat nebo bránit její eliminaci imunitním systémem a spolupodílet se tak na vzniku onemocnění.

Kromě obecných rizikových faktorů, které jsou zmiňovány téměř u všech onemocnění, jako je např. kouření a diabetes mellitus, a které nebyly u RRP zatím prokázány – nejsou u RRP sledovány častěji než u jiné části populace a ani případný mechanismus nebyl identifikován, je jako jeden z faktorů uvažována současná infekce (koinfekce) dalšími patogeny, které, obdobně jako HPV, cílí na stejné místo v lidském těle – na bazální vrstvu epitelu. Vzhledem k tomu, že vliv HPV na karcinom děložního čípku je prokázán delší dobu a týká se většího počtu pacientů než v případě patologií v oblasti hlavy a krku, pochází tyto dosud publikované experimentální údaje dominantně z výzkumu karcinom děložního čípku. Nicméně i zde se stále jedná o experimentální data, která je nutné ověřit dalšími studiemi. Mezi hlavní zvažované patogeny patří:

- Virus lidské imunodeficiency (HIV), který zhoršuje snížením imunitní odpovědi lidského organismu průběh všech infekcí, tedy i HPV. HIV infekce pozitivně koreluje s perzistující infekcí HPV děložního hrdla a s incidencí intraepiteliálních neoplazií i karcinomu (De Vuyst 2008). Celosvětově je u HIV pozitivních žen sledován invazivní karcinom hrdla děložního 2–40krát častěji. Byla také prokázána zvýšená clearance a snížená perzistence HPV i regrese low-grade intraepiteliálních neoplazií hrdla děložního (ale ne snížení prevalence karcinomu) při efektivní antiretrovirové terapii u HIV pozitivních žen.

HIV infekce má také vliv na zvýšenou prevalenci vysoce rizikových HPV (nejčastěji typ 16) a incidenci kondylomat v dutině ústní. Bylo rovněž prokázáno, že více než 60 % nádorů orofaryngu HIV pozitivních pacientů vykazovalo HPV pozitivitu a karcinom mandle, který je ve většině případů spojen s HPV infekcí, se u HIV pozitivních pacientů vyskytoval statisticky častěji (1,5–4krát). Ale obdobně jako u karcinomu děložního čípku ani v případě karcinomu mandle nebylo sledováno snížené riziko jeho vzniku při antivirové terapii v průběhu 10letého sledování (Frisch 2000).

Je předpokládáno, že HIV a HPV spolupůsobí na několika úrovních. Na úrovni imunosuprese, která snižuje schopnost imunitního systému eliminovat HPV infekci. Dále HIV může svými glykoproteiny rozpojit těsné buněčné spoje (tight junction) epitelu a tímto poškozením epitelové bariéry usnadnit vstup HPV k epitelovým buňkám v blízkosti bazální membrány.

- Herpetické viry jsou skupinou virů, která tvoří latentní doživotní infekci u dlouho žijících buněk svého hostitele. Fáze replikace se může odehrávat ve velkém množství typů buněk, převážně ale v buňkách epitelu. Většina herpetických virů je přenášena slinami, ale mohou být přenášeny také pohlavně. Mají tedy podobné cesty přenosu a cílové buňky jako HPV. Převážně se jedná o virus Epstein-Barrové (EBV), herpes simplex virus (HSV) typ 1 a 2 a cytomegalovirus (CMV).

EBV je opakovaně prokazován v karcinomu děložního hrdla (více než 60 % případů) a jeho přítomnost koreluje se závažností nálezu. EBV pozitiva také znamená 5–7násobně větší pravděpodobnost na integraci HPV 16 do hostitelského genomu buněk hrdla děložního. V oblasti hlavy a krku je EBV prokazován v různě velkém procentu také u karcinomu orofaryngu (0–100 %). Velký rozdíl v EBV pozitivitě je dáván do souvislosti s regionálními a etnickými rozdíly. Studie zabývající se pozitivitou EBV v orofaryngeálních dysplaziích a karcinomech zjistila častější pozitivitu v případě dysplazií, což by mohlo ukazovat na možnou roli EBV spíše v počátečních stádiích karcinogeneze. Pouze menšina studií však zkoumala přítomnost EBV u HPV pozitivních orofaryngeálních karcinomů, prostá

přítomnost obou virů byla sledována v 15–20 % případů (Jalouli 2012, Polz-Gruszka 2015), přítomnost aktivních infekcí s vyloučením falešné positivity EBV infiltrujícími lymfocyty byla v 25–70 % (Jiang 2015). Jednou z dalších patologií, ve které je koinfekce HPV a EBV v oblasti hlavy a krku sledována, je karcinom nosohltanu.

HSV koinfekce (převážně HSV-2) se v případě karcinomu děložního hrdla jeví jako riziková, obdobné vlastnosti nebyly zatím sledovány při infekci HSV-1. Bylo sledováno, že pozitivita HSV-2 v séru byla spojena s 2–9krát vyšším rizikem onemocnění karcinomem nebo adenokarcinomem hrdla děložního. Koinfekce HSV-2 a HR HPV byla sledována u 25–30 % intraepiteliálních neoplázií a u 13–25 % karcinomů hrdla děložního ve srovnání s 0–4 % u zdravé tkáně (DiLuca 1987, Zhao 2012). Vliv HSV na nádory v oblasti hlavy a krku nebyl dosud dostatečně zkoumán.

CMV byl detekován v různých typech maligních nádorů, jako například glioblastoma multiforme, karcinomech prostaty, tlustého střeva a prsu. Asociace CMV s těmito nádory však není konstantní a skutečný vliv na kancerogenezi zůstává nejasný.

V oblasti hlavy a krku je dále zvažována možná rizikovost LPR na vznik a průběh RRP. Hypotéza, že LPR by se mohl podílet také na vzniku RRP, vznikla na podkladě výsledků několika studií. Holland et al. retrospektivně hodnotil 31 dětí s RRP, u 12 z nich byla v minulosti provedena diagnostika refluxu pH metrií a u všech zaznamenána alespoň jedna epizoda LPR. Děti byly léčeny inhibitory protonové pumpy a při zpětném hodnocení bylo zjištěno, že se u této skupiny pacientů objevilo méně pooperačních komplikací na měkkých tkáních v hrtanu (Holland 2002). Nebyly však vyšetřeny všechny děti v souboru, samotné vyšetření proběhlo kdykoliv v minulosti, a tedy ve chvíli počátku RRP už LPR nemusel být ani přítomen.

McKenna et al. dále referoval o čtyřech pacientech s dětskou RRP, u kterých došlo na hranici dospělosti k akcentaci onemocnění. U všech těchto pacientů byl pomocí nepřímých ukazatelů (anamnéza a klinické vyšetření) diagnostikován LPR. Byla nasazena terapie inhibitory protonové pumpy a u jednoho pacienta bylo navíc nutné provést fundoplikaci žaludku. Po této terapii došlo k remisi onemocnění (McKenna 2005). LPR tedy nebyl skutečně objektivizován u žádného pacienta. V obou studiích nebyla přítomna kontrolní skupina pacientů.

- FORMANEK, M.*(corresponding author)*, D. JANCATOVA, P. KOMINEK, P. MATOUSEK a K. ZELENIK. *Laryngopharyngeal reflux and herpes simplex virus type 2 are possible risk factors for adult-onset recurrent respiratory papillomatosis (prospective case-control study)*. *Clinical Otolaryngology [online]*. 2017, 42(3), 597–601. ISSN 1749-4478. Dostupné z: doi:10.1111/coa.12779. (IF = 2,696; Q1) (Příloha 1).

Prospektivní série případů a kontrol byla provedena s cílem zjistit možné rizikové faktory RRP, které by se mohly podílet na jejím vzniku. Bylo uvažováno o viru herpes simplex typ 2 (HSV-2), chlamydii trachomatis (ChTr) a laryngofaryngeálním refluxu (LPR). Volba patogenů vycházela z prvních dat studií zaměřující se na výzkum karcinomu děložního čípku. Jednalo se o první studii zvažující zmíněné rizikové faktory u RRP.

Do studie byli zařazeni dospělí pacienti s RRP. Do kontrolní skupiny byli zařazeni dospělí pacienti s cystou hlasivky. U obou skupin byly v průběhu přímé mikrolaryngoskopie odebrány bioptické vzorky – u pacientů s RRP papilomy z hlasivek, u kontrolní skupiny přebývajících sliznice hlasivky po odstranění cysty. Vzorky byly následně hodnoceny imunohistochemicky – přítomnost LPR byla stanovena nepřímo pomocí průkazu pepsinu v cytoplazmě buněk, přítomnost HSV-2, ChTr a HPV přímým průkazem.

Celkem bylo zařazeno 22 pacientů s RRP a 20 pacientů do kontrolní skupiny. Dva pacienti s RRP museli být následně z hodnocení vyloučeni. Ve skupině s RRP bylo více mužů, v kontrolní skupině pak více kuřáků (aktivních i pasivních). Nebyl zjištěn rozdíl mezi skupinami ve věku, BMI, imunodeficienci, diabetu mellitu, astma bronchiale, chronické obstrukční plicní nemoci, alergii, refluxní nemoci jícnu.

Byl prokázán signifikantní rozdíl v přítomnosti LPR a HSV-2. Patologický LPR byl prokázán u 8 z 20 (40 %) pacientů s RRP a u žádného pacienta v kontrolní skupině ($p = 0,003$). HSV-2 byl přítomen u 9 z 20 (45 %) pacientů s RRP a u žádného pacienta v kontrolní skupině ($p = 0,001$). Pět pacientů bylo zároveň pozitivních na LPR i HSV-2. ChTr nebyla prokázána v žádné biopsii. HPV byl přítomen ve všech vzorcích RRP a u dvou z 20 (10 %) pacientů v kontrolní skupině.

Závěr

Pacienti s RRP mají dle imunohistochemického hodnocení biopsie signifikantně častěji LPR a koinfekci HSV-2 ve srovnání s kontrolní skupinou. Na základě těchto prvních výsledků je možné předpokládat, že by se mohlo jednat o rizikové faktory RRP, které se mohou u části pacientů podílet na aktivaci latentní HPV infekce a způsobit tak počátek onemocnění. Vzhledem k tomu, že infekce HSV-2 a HPV jsou sexuálně přenosné, není

vyloučen společný přenos a společné působení také v hrtanu. HSV má sofistikovaný systém blokování odpovědi hostitelské buňky na infekci (Dobbs 2005, Whitley 2001). Možné spolupůsobení HPV a ChTr v hrtanu nebylo prokázáno.

Nelze vyloučit, že průkaz HSV-2 není pouhým náhodným/ vedlejším nálezem. Jednalo se o první studii sledující tuto problematiku, a proto nebylo možné její výsledek srovnat s výsledky jiných studií. K osvětlení skutečného efektu koinfekce je nutné nastavit další studie, které budou sledovat více pacientů, zkoumat přesněji virovou přítomnost. Dále je nutné sledovat změny v genomu a transkriptomu buněk papilomů ve srovnání se zdravou sliznicí a ve srovnání s buňkami papilomů, které HSV-2 neobsahují. Rovněž není možné s jistotou říct, že přítomnost patologického LPR, třebaže byl diagnostikován jednou z nejpřesnějších diagnostických metod, není až následkem změn vyvolaných RRP nebo intubací a direktní mikrolaryngoskopií. Na druhou stranu stanovení přítomnosti pepsinu v cytoplazmě buněk by mělo eliminovat možný falešně pozitivní výsledek daný bezprostředním LPR při operačním výkonu. Toto potvrzuje také negativita pepsinu u kontrolní skupiny pacientů, která podstupovala prakticky totožný chirurgický výkon.

Jak bylo probráno dříve, v době vzniku studie nebyl LPR v případě RRP reálně diagnostikován, pouze nepřímě obtížně odhadován. V roce 2022 byla publikována další studie, do které bylo zařazeno 106 dospělých pacientů, kteří byli rozděleni do tří skupin – pacienti s RRP (36 pacientů), pacienti s LPR (28), zdraví dobrovolníci (42), a byla u nich prokazována přítomnost LPR pomocí dotazníku (Reflux symptom index), endoskopického nálezu (Reflux finding score) a stanovení pepsinu ve slině. Byly sledovány signifikantní rozdíly mezi RRP a zdravými dobrovolníky ve všech sledovaných parametrech, což vedlo k závěru, že je LPR u pacientů s RRP častější než u zdravé populace (Gluvajic 2022). Třebaže stanovení pepsinu ve slině má své limity a neodráží přesný stav v oblasti hrtanu – je prokázán až výrazný LPR dosahující do dutiny ústní, jsou výsledky této studie ve shodě s prezentovanými výsledky.

- *FORMANEK, Martin*(corresponding author)*, Debora FORMANKOVA, Pavel HURNIK, Adela VRTKOVA a Pavel KOMINEK. Epstein-Barr virus may contribute to the pathogenesis of adult-onset recurrent respiratory papillomatosis: A preliminary study. Clinical Otolaryngology [online]. 2021, 46(2), 373–379. ISSN 1749-4478. Dostupné z: doi:10.1111/coa.13681. (IF = 2,729; Q2) (Příloha 2).*

Navazující prospektivní série případů a kontrol je pokračováním předchozí studie (Formánek 2017) s cílem zjistit možné rizikové faktory RRP, které by se mohly podílet na jejím vzniku u dospělých pacientů. Byl rozšířen seznam testovaných patogenů a bylo využito přesnějšího vyšetření pomocí real-time PCR DNA, které umožňuje rovněž kvantitativní hodnocení, a PCR DNA s reverse line blot ke stanovení a typizaci HPV. Byla stanovována přítomnost cytomegaloviru (CMV), viru Epstein-Barrové (EBV), HSV-1 a HSV-2, lidského herpesviru 6 (HHV-6), viru varicella zoster (VZV) a HPV v biopsii. V biopsii byla dále imunohistochemicky sledována proliferační aktivita v různých vrstvách epitelu (dolní, střední a horní třetina) pomocí stanovení proliferačního markeru Ki67 vždy stejným patologem.

Do studie byli zařazeni dospělí pacienti s RRP. Do kontrolní skupiny byli opět zařazeni dospělí pacienti s cystou hlasivky a jinak klidnou sliznicí hrtanu. U obou skupin byly v průběhu přímé mikrolaryngoskopie odebrány bioptické vzorky – u pacientů s RRP papilomy z hlasivek, u kontrolní skupiny přebývajících sliznice hlasivky po odstranění cysty. Celkem bylo zařazeno 18 pacientů s RRP a 18 pacientů do kontrolní skupiny. Skupiny byly ve všech sledovaných parametrech homogenní. HPV byl přítomen ve všech biopsiích pacientů s RRP a v žádné v kontrolní skupině. HPV 6 byl prokázán ve 13, HPV 11 v 5 případech. Žádný jiný genotyp nebyl prokázán. Přítomnost ani typ HPV nebyla závislá na expozici cigaretovému kouři.

Byl prokázán signifikantní rozdíl v přítomnosti EBV. Jeho přítomnost byla sledována u 6 z 18 (33 %) pacientů a u žádného pacienta v kontrolní skupině ($p = 0,019$). Počet kopií viru se pohyboval mezi 350 a 180 000 IU/ml. Přítomnost EBV nebyla závislá na expozici cigaretovému kouři, HPV genotypu ani koncentraci HPV. Přítomnost EBV byla naopak silně spojená s buněčnou proliferací ve všech vrstvách epitelu a počtem operací z důvodu RRP v posledních dvou letech. Proliferační marker Ki67 byl u EBV pozitivních papilomů v dolní třetině epitelu 90, ve střední 20, v horní 7,5 a v průměru 40, u EBV negativních papilomů pak 80, 7, 5, 2 a v průměru 31 ($p = 0,010; 0,023; 0,032; 0,005$). Pacienti s EBV pozitivní RRP prodělali průměrně za poslední dva roky z důvodu progresu onemocnění dva

a půl operačního výkonu ve srovnání s průměrným jedním výkonem u pacientu s EBV negativními papilomy ($p = 0,039$). Tyto výsledky ukazují na možné synergické působení EBV a HPV v rozvoji RRP u částí pacientů. EBV pozitiva naopak nesouvisela se stupněm dysplazie papilomů.

Dále byla ve studii prokázána přítomnost HHV-6 u třech z 18 (16,7 %) pacientů s RRP a u žádného v kontrolní skupině. V jednom případě se jednalo o falešnou pozitivitu z důvodu přítomnosti neinfekční virové DNA, která byla integrovaná do somatického genomu. Dvě biopsie byly pozitivní na EBV i HHV-6 (včetně jedné zmíněné falešně pozitivní biopsie).

Nebylo prokázána přítomnost žádného jiného viru, včetně HSV-2. Na podkladě výsledků těchto přesnějších diagnostických metod se nejeví, že by jiné herpetické viry přispívaly ke vzniku RRP.

Závěr

EBV může synergicky působit s HPV v rozvoji RRP u částí dospělých pacientů, u kterých pak zvyšuje buněčnou proliferaci a přispívá k patogenezi a progresi RRP. Bylo navrženo mnoho možných mechanismů, kterými mohou HPV i EBV interagovat, na jejich potvrzení ale budou nutné další studie. U obou virů byl prokázán vztah k dlaždicobuněčnému epitelu, ve kterém se odehrává životní cyklus HPV i lytická reaktivace EBV (Makielski 2016). Tvrzení je také podloženo výsledky maligních nádorů z oblasti orofaryngu a děložního čípku, kde byla koinfekce EBV a HPV spojena s častějším vznikem, výraznější progresí a větší invazivitou nádorů (deLima 2018, Drop 2017, Jiang 2015, Turunen 2017).

Na druhou stranu není stále ještě dostatečně objasněno, zda EBV přímo/ nepřímo ovlivňuje danou patologii, nebo je jen vedlejším nálezem či důsledkem obecně snížené lokální imunity. EBV může být také pouze přítomen v B lymfocytech, které v rámci reakce organismu např. na invazivní karcinom do místa nádoru migrují. Ne všechna vyšetření detekující jeho přítomnost jsou totiž schopna rozlišit, zda se EBV nachází přímo v epitelu/nádorových buňkách nebo jen v migrujících lymfocytech, kde je jeho přítomnost velmi častá. Zda se tedy jedná o infekci aktivní, nebo latentní. Tato falešná pozitiva by měla být v případě RRP eliminována tím, že se jedná o přísně slizniční patologii nepřecházející přes bazální membránu a bioptické vzorky jsou brány přísně z části papilomů, která ční nad úrovní epitelu, a tedy z oblasti nad bazální membránou. V prezentované studii byl stupeň dysplazie obecně nízký, navíc nezávislý na EBV pozitivitě. V případě, že by se jednalo o falešnou pozitivitu, musela by ta pak být sledována i v buňkách zdravé sliznice u kontrolní skupiny pacientů, uvážíme-li, že u této skupiny nebyly brány vzorky pouze z prostoru nad

bazální membránou (odebrána celá tloušťka sliznice) a je odhadováno, že pozitivní na latentní EBV infekci je až 90 % populace (Tzellos 2012). Počet papilomů s EBV pozitivitou by v případě falešné positivity měl být ze stejného důvodu rovněž vyšší.

- *FORMANEK, Martin*(corresponding author)*, Pavel KOMINEK, Debora JANCATOVA, Lucia STANIKOVA, Radoslava TOMANOVA, Jana VACULOVA, Milan URIK, Ivo SLAPAK a Karol ZELENIK. Laryngopharyngeal Reflux Is a Potential Risk Factor for Juvenile-Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis. Biomed Research International [online]. 2019, 2019, 1463896. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2019/1463896. (IF = 2,276; Q3) (Příloha 3).*

Tato prospektivní studie ve formě série případů, která navazuje na předchozí prvotní výsledky u dospělých pacientů s RRP (Formánek 2017), byla zaměřena na identifikaci možných rizikových faktorů dětské formy RRP. Do studie byly zařazeny děti s RRP, u kterých byly v průběhu přímé mikrolaryngoskopie odebrány bioptické vzorky papilomů hlasivek. Kontrolní skupina nebyla zařazena z důvodu malé prevalence jiných chirurgicky řešených hrtanových patologií u dětí, u kterých by bylo možno jako součást výkonu vzít vzorek zdravé sliznice. Jednalo se o první publikovanou studii, která skutečně prokazovala přítomnost patologického LPR u dětí.

Vzorky byly hodnoceny imunohistochemicky – přítomnost LPR byla stanovena nepřímo pomocí průkazu pepsinu v cytoplazmě buněk papilomů.

Celkem bylo zařazeno 11 dětí s RRP, 6 dívek a pět chlapců v průměrném věku 8 let (4–10 let). Všechny děti v minulosti podstoupily z důvodu RRP nejméně tři chirurgické výkony (4–13 výkonů) a byly terapeuticky očkovány proti HPV vakcínou Silgard® v očkovacím schématu 0, 2 a 4 měsíce od první aplikace. Pět dětí bylo léčeno antivirotickými a imunomodulačními. Žádné dítě nebylo doma vystaveno cigaretovému kouři, u žádného dítěte nebyla sledována předporodní nebo porodní rizika. Tři děti se narodily matce prvorodičce, žádná matka neměla v anamnéze kondylomata ani pozitivní test podle Papanicolaou na přítomnost HPV DNA vysoce rizikových HPV genotypů v buňkách děložního čípku. Věk matek při narození dítěte se pohyboval mezi 22 a 30 lety.

HPV byl prokázán ve všech 11 vzorcích – HPV typ 6 v 9 případech a HPV typ 11 ve dvou případech. Patologický LPR byl zjištěn u pěti z 11 (45 %) dětí, ve čtyřech případech byl spojen s HPV 6 pozitivitou, v jednom případě s HPV 11 pozitivitou.

Závěr

Výsledky první studie, která reálně prokazovala přítomnost patologického LPR u dětí, naznačují, že by LPR mohl být rizikovým faktorem RRP také u části dětí a podílet se společně s HPV infekcí na jejím vzniku a ovlivňovat její průběh. Toto podezření je umocněno také faktem, že u dětí ve sledovaném souboru nebyly přítomny žádné z jiných známých rizikových faktorů, které jsou spojeny s častější přítomností a horším průběhem RRP. Přestože byla k diagnostice LPR využita jedna z nejpřesnějších diagnostických metod, obdobně jako v dříve diskutovaných studiích i tato prvotní studie má své četné limity. Není možné s jistotou říct, že přítomnost LPR není až následkem změn vyvolaných RRP nebo nefyziologickými podmínkami při intubaci a direktní mikrolaryngoskopii, při které je obecně risk aspirace (Warner 1993). Na druhou stranu stanovení přítomnosti pepsinu v cytoplazmě buněk by mělo eliminovat možný falešně pozitivní výsledek daný tímto bezprostředním LPR při operačním výkonu. K limitům u této studie navíc patří absence kontrolní skupiny pacientů. Ta by byla s velkou výhodou zvláště proto, že je odhadovaná obecně vysoká prevalence refluxní nemoci jícnu u dětí, která by dle anamnestických údajů o regurgitacích od rodičů mohla dosahovat maxima ve 4 měsících, kdy by mohla postihovat až dvě třetiny dětí (Nelson 1997). Na druhou stranu s přibývajícím věkem dítěte počet regurgitací dramaticky klesá a v 7 měsících věku je udávaná jen u 14 % dětí. Nejmladší dítě, které bylo zařazeno do studie, mělo 4 roky a prevalence LPR v tomto věku by již měla být výrazně nižší. Výsledek by tedy neměl být zkreslen fyziologicky se vyskytujícím refluxem v dětském věku.

3.1.2 Diagnostika refluxní laryngitidy a laryngofaryngeálního refluxu

Laryngofaryngeální reflux (LPR) je velmi častou patologií (viz kapitola 2.1.2). Nicméně jeho diagnostika a určení skutečného podílu LPR na nemocech hrtanu u konkrétního pacienta nejsou snadné.

Dotazníky zaměřené na odhalení přítomnosti LPR jsou převážně cíleny na "hrtanové příznaky" LPR. Tyto příznaky se ale velmi překrývají s event. příznaky samotných hrtanových patologií - např. chrapot, nucení na odkašlávání a pocit cizího tělesa v krku. Tyto příznaky mohou být přítomné jak u samotného patologického LPR, tak u všech pacientů s hrtanovou patologií způsobenou jiným patofyziologickým mechanismem. Dotazníky proto poskytují velké množství falešně pozitivních výsledků. Také hodnocení známek přítomnosti patologického

LPR podle endoskopického nálezu na sliznicích hrtanu je přítomností lézí v hrtanu ztíženo, mnohdy zcela znemožněno (Formánek 2017).

Vhodnějšími diagnostickými metodami LPR u pacientů s hrtanovými patologiemi proto zůstává jícnová nebo orofaryngeální pH-metrie, jícnová impedance a průkaz pepsinu v sekretech nebo tkáních (viz kapitola 2.2.5). Zlatým standardem v diagnostice LPR v současnosti zůstává 24hodinová jícnová impedance (Hoppp 2012). Jedná se nicméně o metodu, která není pacienty vždy ideálně tolerována a je poměrně zatěžující. Nejsou navíc ustálená hodnotící kritéria, která by jednoznačně určila, že je přítomen patologický LPR. Ve studii Oelschlagera et al. byl u 10 zdravých pacientů medián pěti faryngeálních refluxních epizod (Oelschlager 2006). Na druhou stranu Hoppp et al. ve své studii u 34 zdravých pacientů našel maximálně pouze jednu faryngeální refluxní epizodu (Hoppp 2012).

Průkaz pepsinu v tkáních je ve srovnání s ostatními metodami přesnější, poskytuje informaci o skutečném a dlouhodobém efektu LPR na danou tkáň, a tedy o tom, zda je jeho působení relevantní (Formánek 2015, Jiang 2011). Za fyziologických okolností není totiž v tkáních nad horním jícnovým svěračem přítomen. Nevýhodou vyšetření je nutnost odebrat bioptický vzorek (s rizikem jizvení), který v případě hrtanu většinou vyžaduje celkovou anestézii.

Stanovení hladiny pepsinu v sekretech (např. ze slin) by odbouralo výše zmíněnou nevýhodu. Je proto v současnosti zkoumána přesnost a vhodnost této metody v diagnostice LPR. Dosud publikované práce srovnávaly stanovení pepsinu ve slinách s výsledky dotazníků a endoskopickými nálezy (Barona-Lleo 2019, Spyridoulis 2015, Yadlapati 2016) nebo s výsledky jícnové impedance hodnocených podle diagnostických kritérií pro refluxní nemoc jícnu (Dy 2016, Hayat 2015, Weitzendorfer 2020). Výsledky jsou velmi rozdílné.

- *FORMANEK, Martin*(corresponding author)*, Debora JANCATOVA, Pavel KOMINEK, Radoslava TOMANOVA a Karol ZELENIK. Comparison of Impedance and Pepsin Detection in the Laryngeal Mucosa to Determine Impedance Values that Indicate Pathological Laryngopharyngeal Reflux. Clinical and Translational Gastroenterology [online]. 2017, 8, e123. ISSN 2155-384X. Dostupné z: doi:10.1038/ctg.2017.49. (IF = 4,621; Q1) (Příloha 4).*

Cílem prospektivní studie bylo srovnat výsledky 24hodinové jícnové impedance s dvoukanálovou pH metříí a průkazu pepsinu v biopsii (jako nejpřesnější metody) u stejného pacienta a srovnáním určit hodnoty (hranici) pro výsledek jícnové impedance,

kteře jsou pro postižení hrtanu jasně patologické. Hodnotící kritéria pro jícnovou impedanci dosud totiž nejsou ustálená a není zřejmé, kdy je její výsledek již patologický. Určitý počet refluxních epizod nad horní jícnový svěrač ještě nemusí poškozovat sliznice a je přítomen i u zcela zdravých jedinců (Hoppon 2012, Oelschlager 2006).

Do studie byli zařazeni dospělí pacienti s patologií hrtanu, u které může být zvažován vliv LPR (jako granulom nebo polyp hlasivek a RRP) a která byla indikována k chirurgickému výkonu (mikrolaryngoskopii) v celkové anestézii. Jeden den před výkonem byla všem pacientům provedena za hospitalizace 24hodinová jícnová impedance s dvoukanálovou pH metrií. Při následném výkonu byla část biopsie zaslána k imunohistochemickému průkazu přítomnosti pepsinu v cytoplazmě buněk, a tím k nepřímé diagnostice patologického LPR. Celkem bylo zařazeno 30 pacientů (16 mužů a 14 žen) s průměrným věkem 43,7 let. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin v závislosti na pozitivitě přítomnosti pepsinu v biopsii. Počet celkových refluxních hltanových epizod u pacientů bez průkazu pepsinu byl v průměru 2,4 a pohyboval se v rozmezí 0–5 epizod, u pacientů s průkazem pepsinu pak byl průměrný počet 16 v rozmezí 6–39 epizod ($p < 0,001$). Byl také sledován signifikantní rozdíl v počtu kyselých, slabě kyselých i zásaditých epizod ($p < 0,001$; 0,0216; 0,0281). Byla stanovena hranice patologického výsledku impedance (a patologického LPR) na počet 6 a více celkových hltanových refluxních epizod, které měla 100procentní senzitivitu i specificitu (interval spolehlivosti 73,5–100 % a 81,4–100 %).

Data z jícnového senzoru, který diagnostikuje refluxní nemoc jícnu, prokázala v průměru 9 jícnových refluxních epizod (při rozmezí 2 až 23 epizod) u pacientů bez průkazu pepsinu v biopsii a v průměru 25 epizod (při rozmezí 8 až 58 epizod) u pacientů s průkazem pepsinu ($p = 0,001$). Byl sledován také signifikantní rozdíl v poměru kyselých a zásaditých jícnových refluxních epizod s větším počtem v pepsin-pozitivní skupině ($p = 0,0004$; 0,0281). Rovněž celkových čas strávený v kyselém prostředí a DeMeesterovo skóre bylo signifikantně vyšší u pacientů s pozitivním pepsinem v biopsii ($p = 0,0002$; 0,0015). Byla stanovena hranice patologického výsledku impedance pro jícnový senzor pro patologický LPR na počet 16 a více celkových jícnových refluxních epizod, které měla 83,3procentní senzitivitu a 88,9procentní specificitu (interval spolehlivosti 51,6–97,9 % a 65,3–98,6 %). Data z jícnového senzoru měla tedy očekávaně senzitivu i specificitu diagnosticky LPR nižší.

Závěr

První studií svého druhu byla srovnáním s nejpřesnější diagnostickou metodou významného LPR zjištěna hranice patologického výsledku jícnové impedance na počet 6 a

více celkových hltanových refluxních epizod. Tato hodnota znamená přítomnost patologického LPR a měla by být používána při hodnocení vyšetření v případech hrtanových patologií. Podezření na patologický LPR by měl vzbudit také nález celkového počtu 16 a více jícnových refluxních epizod při vyšetřování refluxní nemoci jícnu. Je třeba ale mít na zřeteli, že do studie byl zařazen relativně malý počet pacientů a zcela jednoznačný patologický výsledek počtu hltanových epizod při jícnové impedanci, který ukazuje na patologický LPR je spíše překvapivý. Ze znalostí LPR lze očekávat, že zařazením většího počtu pacientů a diagnóz by se hranice pro patologii stala méně jednoznačnou, a je jí proto nutno brát spíše jako odrazovou hranici a každý výsledek jícnové impedance je nutno posuzovat individuálně a korelovat s ostatními hodnotami a obtížemi pacienta.

- *ZELENIK, Karol, Viktoria HRANKOVA, Adela VRTKOVA, Lucia STANIKOVA, Pavel KOMINEK a Martin FORMANEK*(corresponding author)*. Diagnostic Value of the Peptest(TM) in Detecting Laryngopharyngeal Reflux. Journal of Clinical Medicine [online]. 2021, 10(13), 2996. Dostupné z: doi:10.3390/jcm10132996. (IF = 4,964; Q2) (Příloha 5).*

Prospektivní navazující studie (Formánek 2017) byla zaměřena na ověření vhodnosti použití stanovení pepsinu ve slině jako diagnostické metody LPR, což by výrazně zjednodušilo, zpříjemnilo a zefektivnilo celý diagnostický proces. Hlavní nevýhodou stanovení pepsinu je totiž nutnost odběru vzorku, což v případě hrtanu znamená invazivní výkon s jeho možnými následky, který je navíc mnohdy nutno provést v celkové anestézii. Tato nevýhoda by byla odbourána, pokud by stanovení pepsinu ve snadno získatelném sekretu (např. slina) spolehlivě diagnostikovalo LPR ovlivňující sliznice hrtanu. Výsledky stanovení pepsinu ze slin byly proto v této studii srovnávány s výsledky 24hodinové jícnové impedance s dvoukanálovou pH metrií u stejného pacienta. K hodnocení patologického LPR při jícnové impedanci bylo mimo jiné využito při předchozí studii zjištěné patologické hranice 6 celkových refluxních hltanových epizod (Formánek 2017).

Do studie byli zařazeni dospělí pacienti jdoucí k vyšetření 24hodinovou jícnovou impedancí s dvoukanálovou pH metrií. Před zavedením sondy byl odebrán vzorek slin a vyhodnocen komerční metodou PeptestTM na přítomnost pepsinu. Byla zhodnocena přítomnost LPR dotazníky (Reflux symptom index) a endoskopickým nálezem (Reflux finding score). Následně proběhlo zavedení sondy a standardní vyšetření jícnovou impedancí.

Celkem bylo hodnoceno 46 po sobě jdoucích pacientů (30 žen a 16 mužů) ve věku 36–62 let. Srovnání bylo provedeno na dvou patologických hodnotách 24hodinové jícnové impedance. V prvním případě byla považována za patologickou jakákoliv hltanová refluxní epizoda (Hoppo 2012), v druhém případě bylo pak považováno 6 a více celkových hltanových epizod jako patologická hodnota (Formánek 2017).

Přesnost PeptestuTM při srovnání s jednou hltanovou refluxní epizodou při jícnové impedanci byla 35 %, sensitivita 33 %, specificita 100 %, pozitivní prediktivní hodnota 100 % a negativní prediktivní hodnota 3 %. Přesnost PeptestuTM při srovnání se 6 celkovými hltanovými refluxními epizodami při jícnové impedanci byla 48 %, sensitivita 37 %, specificita 82 %, pozitivní prediktivní hodnota 87 % a negativní prediktivní hodnota 29 %.

Přesnost dotazníku Reflux symptom index při srovnání s jednou hltanovou refluxní epizodou při jícnové impedanci byla 39 %, sensitivita 40 %, specificita 0 %, pozitivní prediktivní hodnota 95 % a negativní prediktivní hodnota 0 %. Přesnost dotazníku při srovnání se 6 celkovými hltanovými refluxními epizodami při jícnové impedanci byla 39 %, sensitivita 37 %, specificita 46 %, pozitivní prediktivní hodnota 68 % a negativní prediktivní hodnota 19 %.

Přesnost endoskopického stanovení přítomnosti LPR (Reflux finding score) při srovnání s jednou hltanovou refluxní epizodou při jícnové impedanci byla 57 %, sensitivita 58 %, specificita 0 %, pozitivní prediktivní hodnota 96 % a negativní prediktivní hodnota 0 %. Přesnost endoskopického stanovení při srovnání se 6 celkovými hltanovými refluxními epizodami při jícnové impedanci byla 52 %, sensitivita 57 %, specificita 36 %, pozitivní prediktivní hodnota 74 % a negativní prediktivní hodnota 21 %.

Závěr

Na základě výsledků studie vyšetření přítomnosti pepsinu ve slinách metodou PeptestTM neodpovídá dostatečně, obdobně jako dotazníky či endoskopické hodnocení, výsledkům 24hodinové jícnové impedance, a nemůže proto toto vyšetření v diagnostice LPR zcela nahradit. Mohl by ale sloužit jako screeningový test, který v případě své positivity odhalí závažný LPR a umožní indikovat jeho léčbu. V případě jeho negativity je nutno pokračovat v další diagnostice. Před rutinním využitím PeptestuTM jako screeningové metody bude ale nutno dořešit správné nastavení vyšetření. Výsledky stanovení pepsinu v ranních slinách se totiž jeví závislé mimo jiné na potravě, která byla konzumována v předvečer odběru (Lechien 2021).

3.1.3 Využití nových optických metod

3.1.3.1 Optické metody využívající filtrovaného světla nebo úpravu obrazu

V posledních letech dochází díky pokroku v technologiích také ke snaze o vylepšení vlastností endoskopie a endoskopického obrazu. Cílem je zlepšit jejich diagnostické možnosti (viz kapitola 2.2.2). Nejpoužívanějšími systémy jsou v současnosti optické metody využívající filtrovaného světla (NBI) a metody využívající postprocesingovou softwarovou úpravu obrazu (IMAGE1 S) (Piazza 2008, Puxeddu 2015).

Obě optické metody mají za cíl detailně zobrazit slizniční nález a zároveň umožnit hodnocení podslizniční vaskularizace. Zhodnocení vaskularizace pak umožňuje zachytit časněji hrtanovou patologii a přesněji určit, kdy je sledovaná patologie spíše benigní a kdy je naopak podezřelá z eventuální maligní transformace (Piazza 2008). V případě hrtanu je tak možné snížit počet celkových anestézií, které musí pacienti podstupovat k odebrání biopsie a verifikaci procesu, ať už v rámci primární diagnostiky nebo následné dispenzarizace.

Zmíněné systémy jsou ale pořád ještě poměrně nové a stále je ověřována jejich senzitivita a specifická a upravováno hodnocení nálezů (Staníková 2018). Dosud zatím také nebyla srovnána přesnost a výtěžnost jednotlivých systémů mezi sebou, což by byla, vzhledem k jejich výrazně rozdílné nákladnosti, velmi přínosná data. V poslední době je také soustředěna pozornost i na jiné (pre)maligní procesy a postupem času jsou popisovány typické nálezy pro jiné, často velmi vzácné, diagnózy.

- STANIKOVA, L., R. WALDEROVA, D. JANCATOVA, M. FORMANEK, K. ZELENIK a Pavel KOMINEK. *Comparison of narrow band imaging and the Storz Professional Image Enhancement System for detection of laryngeal and hypopharyngeal pathologies. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology [online]. 2018, 275(7), 1819–1825. ISSN 0937-4477. Dostupné z: doi:10.1007/s00405-018-4987-3. (IF = 1,750; Q2) (Příloha 6).*

Prospektivní studie měla za cíl srovnat nálezy hrtanové vaskularizace hodnocené pomocí optické metody využívající filtrovaného světla (NBI) a metody využívající postprocesingovou softwarovou úpravu obrazu (IMAGE1 S) u stejného pacienta. Systém NBI byl využíván ambulantně při flexibilní videoendoskopii, systémem IMAGE1 S pak při zvětšovací videoendoskopii v celkové anestézii. Jednalo se o první práci svého druhu.

Do studie byli zařazeni dospělí pacienti, kteří z důvodu hrtanové patologie podstoupili přímou laryngoskopii v celkové anestézii. Nález byl nejprve hodnocen flexibilní videoendoskopií s NBI dva až tři týdny před chirurgickým výkonem. Nález byl následně peroperačně hodnocen zvětšovací endoskopií s IMAGE1 S. Vaskulární změny byly vždy rozděleny do stupňů dle Arensa (Arens 2016). Optické nálezy byly srovnány s výsledkem histologie.

Celkem bylo do studie zařazeno 73 pacientů (50 mužů a 23 žen) v průměrném věku 51 let. Histologicky bylo prokázáno 26 (35,6 %) benigních lézí, ke kterým patřily polypy, cysty, chronické záněty a hyperkeratózy, 16 (21,9 %) papilomů v rámci RRP, 7 (9,6 %) lehkých dysplazií a 24 (32,9 %) případů těžké dysplazie nebo karcinomu in situ nebo invazivního karcinomu. Benigní léze byly správně identifikovány oběma systémy shodně ve 20 (76,9 %) případech. Systém NBI správně identifikoval 15 (93,8 %) případů RRP, systém IMAGE1 S správně identifikoval všechny případy RRP. Lehká dysplazie byla správně identifikována oběma systémy shodně v 6 (85,7 %) případech. Léze s vyšším stupněm dysplazie byly správně identifikovány systémem NBI v 19 (79,2 %) případech, systém IMAGE1 S v 18 (75 %) případech.

Senzitivita systému NBI byla 83 %, specificita 98 %. Senzitivita systému IMAGE1 S byla 86 %, specificita 96 %. Míra shody s výsledkem biopsie byla u systému NBI 81,43 % ($\kappa = 0,7428$; $p < 0,001$), u systému IMAGE1S 81,16 % ($\kappa = 0,7379$; $p < 0,001$). Míra shody výsledků těchto dvou optických systémů navzájem pak byla téměř dokonalá 92,54 % ($\kappa = 0,8965$; $p < 0,001$).

Závěr

Výsledky prvního srovnání endoskopického hodnocení hrtanové vaskularizace a jejím prostřednictvím určení charakteru hrtanové patologie se jeví u systému NBI a IMAGE1 S jako srovnatelné. Je nutné poznamenat, že výsledek může být ovlivněn technikou provedení jednotlivých vyšetření – flexibilní videoendoskopií v lokální a zvětšovací endoskopií v celkové anestézii, a jejich specifiky.

- STANIKOVA, Lucia, Martin FORMANEK, Pavel HURNIK, Peter KANTOR, Pavel KOMINEK a Karol ZELENIK. *Diagnosis of Laryngeal Pemphigus Vulgaris Can Be Facilitated Using Advanced Endoscopic Methods. Medicina-Lithuania [online]. 2021, 57(7), 686. ISSN 1010-660X. Dostupné z: doi:10.3390/medicina57070686. (IF = 2,948; Q3) (Příloha 7).*

Bylo zjištěno, že u pacientů s pemphigus vulgaris je častěji sledován karcinom hrtanu (Kridin 2018). Tato série případů retrospektivně analyzuje obraz histologicky (a přímou imunofluorescencí) potvrzených diagnóz pemphigus vulgaris na sliznicích hrtanu při optických metodách využívajících filtrovaného světla nebo softwarovou úpravu obrazu. Možnost diagnostikovat tuto diagnózu endoskopicky by znamenala ušetřit pacienta jedné až dvou celkových anestézií, poměrně dlouhého čekání na histologický výsledek a začátek léčby. Jedná se o natolik vzácnou diagnózu (zvláště v hrtanu), že na ní není většinou primárně myšleno a biopsie je zaslána ve formaldehydu na standardní histologické zhodnocení. Pro definitivní průkaz pemphigus vulgaris je ale nutné provést přímou imunofluorescencí z nativně zaslaného bioptického vzorku, kdy jsou prokázána intracelulární depozita IgG a C3. Proto je většinou nutná další celková anestézie s dalším odběrem tkáně z hrtanu.

Z 278 hrtanových nálezů byly identifikovány tři případy pemphigus vulgaris na sliznici hrtanu. Byly identifikovány typické znaky obrazu pemphigus vulgaris při optických metodách využívajících filtrovaného světla nebo úpravu obrazu. Léze je mírně vystouplá nad povrch a je částečně kryta různě širokou vrstvou leukoplakie. V místech, kde není leukoplakie, jsou přítomny velmi tenké a krátké intraepiteliální papilární kapilární klíčky, které běží k povrchu, jsou symetricky a pravidelně uspořádány, neostře ohraničeny. Svým celkovým vzhledem připomínají mapu vrstevnic. Obdobný obraz nebyl sledován u žádné z jiných hrtanových patologií.

Závěr

Pemphigus vulgaris má v hrtanu při použití pokročilých videoendoskopických metod zcela typický obraz, který umožňuje vyslovit jasné podezření na tuto patologii, a tak urychlit diagnostiku i léčbu.

3.2 Léčba prekanceróz a karcinomu hrtanu a jejích následků

3.2.1 Chirurgická léčba

Obdobně jako diagnostika, tak také chirurgická léčba hrtanových patologií doznala v posledních několika dekádách výrazný posun. Posun byl umožněn pokrokem v materiálech a technologiích. Rozvojem endoskopů a laserové chirurgie došlo ke změně provádění výkonů, a to z výkonů prováděných ze zevního přístupu (laryngofisura), které byly v minulosti dominantní, na výkony prováděné transorálně endo/ mikrolaryngoskopicky (viz kapitola 2.3.2). V případě maligních procesů dostávají více prostoru nechirurgické metody v podobě radio(chemo)terapie.

Resekční výkony jsou obecně více cílené, snaží se dosažení žádané radikality za maximálního šetření okolní zdravé tkáně. Častěji se jedná o výkony parciální. Protože se ale stále jedná o relativně nový trend, a protože se dále a dále rozšiřují indikace pro tyto výkony, jsou ještě zjišťovány jejich léčebné možnosti a s nimi spojené množství komplikací. Ty v případě hrtanu, a zvláště hlasivek, reprezentuje nejčastěji stav hlasu. Nejen proto se hlasu začala věnovat větší pozornost a došlo k rozvoji celého chirurgického přístupu k hlasu s názvem fonochirurgie (Vilaseca 2008). Jeho součástí jsou mimo jiné techniky zlepšující nedostatečně kvalitní hlas. Patrně nejvýraznější vývoj je sledován v případě augmentačních technik hlasivek, které jsou obecně indikovány při nekvalitním hlasu z důvodu fonační insuficience o velikosti přibližně tři milimetry a menší při nedostatečném efektu hlasové terapie. Fonační insuficience velmi často souvisí se stavem po resekčních výkonech prekanceróz a karcinomů hrtanu. Výzkum je v těchto případech cílen na efekt různých typů krátkodobých i trvalých augmentačních materiálů jako možných náhrad za autologní tukovou tkáň (Mallur 2010, Rosen 2009).

- STANIKOVA, Lucia, Karol ZELENIK, Martin FORMANEK, Jana SEKO, Radana WALDEROVA, Peter KANTOR a Pavel KOMINEK. *Evolution of voice after transoral laser cordectomy for precancerous lesions and early glottic cancer. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology [online]. 2021, 278(8), 2899–2906. ISSN 0937-4477. Dostupné z: doi:10.1007/s00405-021-06751-3. (IF = 3,236; Q2) (Příloha 8).*

Cílem prospektivní studie bylo zhodnotit vývoj kvality hlasu pacientů po transorální laserové chordektomii provedené pro těžkou dysplazii, karcinom in situ nebo T1 a T2 invazivní karcinom hlasivky. Podle dosud uveřejněných výsledků byla za 6 až 24 měsíců od operace sledována dobrá výsledná kvalita hlasu po subepiteliálních a subligamentózních chordektomiích, ale špatná kvalita hlasu u rozsáhlejších výkonů, která je srovnatelná s předoperačním stavem (Peretti 2003, Vilaseca 2008, Roh 2007). Dosud ale nebyly studie zaměřeny na časnou pooperační dynamiku vývoje hlasu, a nebylo tak možné pacientům poradit, za jak dlouho se jejich hlas upraví.

Do studie byli zařazeni dospělí pacienti, kteří podstupovali jednostrannou transorální laserovou chordektomii z důvodu premaligní nebo maligní (do rozsahu T2 dle TNM klasifikace) léze hlasivky. Hlas byl hodnocen třemi kliniky dle GRBAS skóre (0 = norma, 1 = mírná postižení, 2 = střední postižení, 3 = těžké postižení), dále byly hodnoceny aerodynamické (maximální fonační čas) a akustické (jitter a shimmer) hlasové parametry (Hirano 1981). Hodnocení proběhlo předoperačně, za 6 týdnů a za 6 měsíců po operaci.

Celkem bylo zařazeno 25 pacientů, hodnoceno bylo 18 pacientů (17 mužů a jedna žena) ve věku 48–83 let. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin dle rozsahu provedeného výkonu. Nebyl rozdíl ve věku pacientů mezi skupinami.

Do první skupiny bylo zařazeno 11 pacientů po subepiteliální nebo subligamentózní chordektomii. Dle GRBAS skóre byl hlas u těchto pacientů 6 týdnů po operaci bez zlepšení, 6 měsíců po operaci byl kvalitnější než před operací. Nebyla sledována signifikantní změna v aerodynamických parametrech před, ani v žádných měřeních po operaci. Nebyl sledován signifikantní rozdíl v akustických hlasových parametrech před a po výkonu, pouze signifikantní zlepšení mezi stavem za 6 týdnů a 6 měsíců po operaci.

Do druhé skupiny bylo zařazeno 7 pacientů po rozsáhlejším typu chordektomie. GRBAS skóre i aerodynamické parametry hlasu byly u těchto pacientů signifikantně horší za 6 týdnů i 6 měsíců po operaci. Akustické hlasové parametry byly po 6 týdnech ještě zhoršeny, po 6 měsících pak došlo k jejich signifikantnímu zlepšení na předoperační úroveň. U žádného pacienta nebyla po roce sledování odhalena recidiva onemocnění.

Závěr

Výsledky studie ukazují, že výsledná kvalita hlasu je závislá na rozsahu resekce hlasivky. Subepiteliální a subligamentózní chordektomie je spojená s dobrou pooperační kvalitou hlasu, který může být postupem času lepší než před operací. Je proto možno doporučit chirurgickou terapii tohoto rozsahu také u hlasových profesionálů. Nicméně je nutné pacienty připravit na to, že úprava hlasu bude trvat déle než 6 týdnů. V případě rozsáhlejších výkonů by měli být pacienti poučeni, že výsledná kvalita hlasu bude špatná, u hlasových profesionálů je proto ke zvážení při vědomí obdobného léčebného efektu primární léčba radioterapií.

- *ZELENIK, Karol, Martin FORMANEK, Radana WALDEROVA, Debora FORMANKOVA a Pavel KOMINEK. Five-year results of vocal fold augmentation using autologous fat or calcium hydroxylapatite. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology [online]. 2021, 278(4), 1139–1144. ISSN 0937-4477. Dostupné z: doi:10.1007/s00405-020-06479-6. (IF = 3,236; Q2) (Příloha 9).*

Retrospektivní analýza měla za cíl porovnat dlouhodobé výsledky augmentace hlasivky autologním tukem z umbilikální krajiny provedené při přímé mikrolaryngoskopii v celkové anestézii s výsledky augmentace hlasivky trvalým materiálem kalcium hydroxyapatitem (Radiesse® Voice) provedené ambulantně v lokální anestézii. Byly srovnávány výsledky po pěti letech. Takto dlouhodobá data nebyla dosud publikována, nejčastěji jsou uváděny výsledky po jednom roce (Mallur 2010, Rosen 2009). Nebylo proto možné pacientům odpovědně sdělit, o jak dlouhodobé řešení jejich hlasového problému se jedná.

Do analýzy byli zařazeni pacienti s fonační insuficiencí o velikosti tři milimetry a menší. Byla sledována subjektivní spokojenost pacientů se svým hlasem, voice handicap index (VHI) a maximální fonační čas.

Celkem bylo zařazeno 36 pacientů, z toho 7 pacientů bylo postupně ztraceno ze sledování do kontroly po pěti letech a tři pacienti museli v průběhu této doby podstoupit opakování výkonu – tito pacienti museli být z hodnocení vyřazeni. Analyzováno bylo tedy 26 pacientů (15 žen a 11 mužů) – 13 (8 žen, 5 mužů) pacientů po augmentaci tukem v průměrném věku 56,5 let a 13 (7 žen, 6 mužů) pacientů augmentovaných kalcium hydroxyapatitem v průměrném věku 63,3 let. Celkem byla po 5 letech subjektivní spokojenost s hlasem v 19 (73,1 %) případech. Zlepšení ve VHI ve skupině augmentované autologním tukem bylo

průměrně o $28,8 \pm 17,82$ bodů, ve skupině augmentované kalcium hydroxyapatitem průměrně o $33 \pm 26,24$ bodů ($p = 0,458$). V maximálním fonačním času bylo ve skupině augmentované tukem zlepšení průměrně o $6 \pm 3,42$ sekund, ve skupině augmentované kalcium hydroxyapatitem o $6,3 \pm 4,34$ sekund ($p = 0,667$). Nebyl tedy sledován signifikantní rozdíl mezi skupinami v žádném hodnoceném parametru.

Závěr

Obě techniky augmentace a materiály dosahují velmi dobrých výsledků i po pěti letech, tyto výsledky jsou u obou materiálů srovnatelné. Obě techniky lze proto doporučit a o preferenci jedné nebo druhé by měly rozhodovat další faktory jako možnost provedení v lokální anestézii, finanční a časová náročnost, rizikovost celkové anestézie.

3.2.2 Nechirurgická léčba

Nechirurgická léčba hrtanových prekanceróz je patrně nejdynamičtěji se rozvíjející oblastí v laryngologii. Platí to hlavně v případě medikamentózní adjuvantní léčby RRP (viz kapitola 2.3.1). Jejím hlavním cílem je co možná největší snížení počtu chirurgických výkonů. Látky jsou podávány většinou místně nebo vzácněji systémově. Vývoj v této oblasti těží z rozvoje léčby jiných onkologických onemocnění a poznatků o HPV. Vzhledem k tomu, že se v případě hrtanu jedná o nové indikace, které jsou stále celosvětově v režimu off-label použití a u kterých nejsou dostatečně prozkoumané nežádoucí účinky, není ještě ustáleno doporučení kdy a jakou látku zvolit.

Nejčastěji je používána lokální aplikace látky bevacizumab do oblasti výskytu papilomů, která dle dosud uveřejněné literatury nebyla při lokálním podání v hrtanu spojena s výskytem žádných komplikací (Sidell 2021, Zeitels 2011). Jedná se o humanizovanou monoklonální protilátku technologií DNA v ovariálních buňkách čínských křečků. Váže se selektivně na vaskulární endotelový růstový faktor A. Bevacizumab byl původně vyvinut (schválen v USA roce 2004) pro léčbu metastatického kolorektálního karcinomu (Starling 2004).

- ZELENIK, Karol, Pavel KOMINEK, Lucia STANIKOVA a Martin FORMANEK*(corresponding author)*. *Local Bevacizumab Treatment of Juvenile-Onset Respiratory Papillomatosis Might Induce Multiple Tracheal Pyogenic Granulomas*. *Laryngoscope* [online]. 2021, 131(2), E518–E520. ISSN 0023-852X. Dostupné z: doi:10.1002/lary.28928. (IF = 2,970; Q2) (Příloha 10).

Práce prezentuje kazuistické sdělení dvouleté pacientky s dětskou formou RRP, která pro svůj úporný průběh vyžadovala za posledních 6 měsíců pět chirurgických výkonů. Ty byly v posledních třech případech vždy doplněny o lokální aplikaci bevacizumabu (12, 16 a 16 mg). Při posledním výkonu bylo navíc nutno použít supraglotickou tryskovou ventilaci na místo klasické orotracheální intubace. Při dalším (šestém) chirurgickém výkonu, který bylo nutno provést za další tři měsíce pro opětovný výrazný nárůst papilomů na hlasívkách, byly nalezeny vícečetné pyogenní granulomy v průdušnici. Ty byly následně potvrzeny i histologicky. Bylo indikováno sledování a při kontrolním výkonu (sedmém) za 4 měsíce již byl nález v průdušnici klidný. Jedná se o první publikovaný nežádoucí účinek lokální aplikace bevacizumabu do oblasti hrtanu. Autoři předpokládají, že vznik granulomů byl podpořen současným použitím supraglotické tryskové ventilace, které umožnila šíření bevacizumabu do sliznice průdušnice.

Závěr

Práce dokumentuje na kazuistickém sdělení pacientky s úpornou dětskou formou RRP první dosud publikované nežádoucí účinky lokální aplikace bevacizumabu do oblasti hrtanu – vznik vícečetných pyogenních granulomů v průdušnici. Jeví se, že vznik granulomů byl podpořen současným použitím supraglotické tryskové ventilace a její použití při současné lokální aplikaci bevacizumabu musí být pečlivě zváženo.

4 ZÁVĚR

- *Výzkum rizikových faktorů recidivující respirační papilomatózy*
Byly zkoumány možné nové rizikové faktory RRP, které by mohly spolupůsobit s HPV ve smyslu aktivace latentní infekce a způsobit tak počátek onemocnění. Dle výsledků našich studií by mohl být tímto rizikovým faktorem RRP u dospělých i dětí LPR. U dospělých by pak mohla být dalším rizikovým faktorem koinfekce herpetickými viry, zvláště EBV, který může synergicky působit s HPV, zvyšovat buněčnou proliferaci a přispívat k patogenezi a progresi RRP.
- *Diagnostika refluxní laryngitidy a laryngofaryngeálního refluxu*
Naše studie byly zacíleny na zpřesnění a zjednodušení diagnostiky LPR k ověření jeho skutečného efektu u daného pacienta. Byla zjištěna hranice jasně patologického výsledku jícnové impedance na počet 6 a více celkových hltanových refluxních epizod. Tato hodnota znamená přítomnost patologického LPR a měla by být používána při hodnocení vyšetření v případě hrtanových patologií. Dále bylo zkoumáno stanovení pepsinu ve slinách jako vhodné diagnostické metody LPR. Bylo zjištěno, že toto vyšetření by mohlo sloužit jako screeningový test, který v případě své pozitivity odhalí závažný LPR a umožní indikovat jeho léčbu. V případě jeho negativity je nutno pokračovat v další diagnostice.
- *Využití nových optických metod k detekci hrtanových prekanceróz a karcinomu*
Byly srovnány výsledky různých endoskopických systémů, které zlepšují možnosti hodnocení hrtanové vaskularizace a jejím prostřednictvím určení charakteru hrtanové patologie. Bylo zjištěno, že výsledky systémů využívajících filtrované světlo a systémů, které obraz následně softwarově upravují, se jeví jako srovnatelné. Dále byl při použití těchto metod popsán zcela typický obraz Pemphigus vulgaris v hrtanu, který by mohl urychlit diagnostiku i léčbu tohoto onemocnění.
- *Chirurgická léčba prekanceróz a karcinomu hrtanu a jejích následků*
Výsledky studie hodnotící časný vývoj kvality hlasu po chordektomii ukazují, že výsledná kvalita hlasu je závislá na rozsahu resekce. Subepiteliální a subligamentózní chordektomie jsou spojeny s dobrou pooperační kvalitou hlasu a je možno je proto doporučit. Úprava hlasu bude ale trvat déle než 6 týdnů. V případě rozsáhlejších výkonů je kvalita hlasu špatná a u hlasových profesionálů by měla být preferovaná radioterapie. V případě pooperačně zhoršeného hlasu je možné doporučit jeho kompenzaci augmentací hlasivky autologním tukem i umělým trvalým materiálem, které mají shodně výborný dlouhodobý efekt.

- *Nechirurgická léčba prekanceróz hrtanu*

S určitou mírou obezřetnosti by měla být indikována lokální adjuvantní léčba dětské RRP bevacizumabem, protože může vést ke vzniku komplikací ve smyslu rozvoje vícečetných pyogenních granulomů.

5 LITERATURA

1. Ali SA, Smith JD, Hogikyan ND. The White Lesion, Hyperkeratosis, and Dysplasia. *Otolaryngol Clin North Am.* 2019;52(4):703-712.
2. Arens C, Piazza C, Andrea M, Dikkers FG, Tjon Pian Gi REA, Voigt-Zimmermann Z, Peretti G. Proposal for a descriptive guideline of vascular changes in lesions of the vocal folds by the committee on endoscopic laryngeal imaging of the European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2016;73(5):1207–14.
3. Awad R, Shamil E, Aymat-Torrente A, Gibbins N, Harris S. Management of laryngeal papillomatosis using coblation: another option of surgical intervention. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2019;276(3):793-800.
4. Bao YY, Jiang Q, Li ZW, Yu E, Zhou SH, Yao HT, Fan J, Yong WW. Gastric H+/K+-ATPase expression in normal laryngeal tissue and laryngeal carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2020;13:12919–12931.
5. Barona-Lleo L, Guzman, RB-D, Krstulovic C. The Diagnostic Usefulness of the Salivary Pepsin Test in Symptomatic Laryngopharyngeal Reflux. *J. Voice* 2019, 33, 923–8.
6. Bedard MC, de Alarcon A, Kou YF, Lee D, Sestito A, Duggins AL, Brusadelli M, Lane A, Wikenheiser-Brokamp KA, Wells SI, Smith DF. HPV Strain Predicts Severity of Juvenile-Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis with Implications for Disease Screening. *Cancers (Basel).* 2021;13(11):2556.
7. Belafsky PC, Postma GN, Koufman JA. The validity and reliability of the reflux finding score. *Laryngoscope.* 2001;111(8):1313-7.
8. Belafsky PC. Debate: Treatment of Chronic Throat Symptoms with PPIs Should Be Preceded by pH Monitoring. Pro: Empiric Treatment with PPIs Is. Not Appropriate Without Testing. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(1):6-11.
9. Bergenfelz A, Jansson S, Kristofersson A, Mårtensson H, Reihner E, Wallin G, Lausen I. Complications to thyroid surgery: results as reported in a database from a multicenter audit comprising 3660 patients. *Langenbecks Arch Surg* 2008;393(5):667–73.
10. Bonagura VR, Hatam LJ, Rosenthal DW, de Voti JA, Lam F, Steinberg BM, Abramson AL. Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and -11. *APMIS.* 2010 Jun;118(6-7):455-70.

11. Campisi P, Hawkes M, Simpson K. The epidemiology of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis derived from a population level national database. *Laryngoscope*. 2010;120(6):1233-45.
12. Campo MS, Roden RB. Papillomavirus Prophylactic Vaccines: Established Successes, New Approaches. *J Virol*. 2010;84(3):1214-20.
13. Carifi M, Napolitano D, Morandi M, Dall'Olio D. Recurrent respiratory papillomatosis: current and future perspectives. *Ther Clin Risk Manag*. 2015;11:731-8.
14. Combes JD, Dalstein V, Gheit T, Clifford GM, Tommasino M, Clavel C, Lacau St Guily J, Franceschi S; SPLIT study group. Prevalence of human papillomavirus in tonsil brushings and gargles in cancer-free patients: The SPLIT study. *Oral Oncol*. 2017;66:52-57.
15. Cui W, Xu W, Yang Q, Hu R. Clinicopathological parameters associated with histological background and recurrence after surgical intervention of vocal cord leukoplakia. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(22):e7033.
16. Culp TD, Budgeon LR, Christensen ND. Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor. *Virology* 2006;347(1):147-1.
17. De Vuyst H, Lillo F, Broutet N, Smith JS. HIV, human papillomavirus, and cervical neoplasia and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Cancer Prev*. 2008;17(6):545-54.
18. Di Luca D, Rotola A, Pilotti S, Monini P, Caselli E, Rilke F, Cassai E. Simultaneous presence of herpes simplex and human papilloma virus sequences in human genital tumors. *Int J Cancer*. 1987;40(6):763-8.
19. Dobbs ME, Strasser JE, Chu CF, Chalk C, Milligan GN. Clearance of herpes simplex virus type 2 by CD8+ T cells requires gamma interferon and either perforin- or Fas-mediated cytolytic mechanisms. *J Virol*. 2005;79(23):14546-54.
20. Chandrasekhar SS, Randolph GW, Seidman MD, Rosenfeld RM, Angelos P, Barkmeier-Kraemer J, Benninger MS, Blumin JH, Dennis G, Hanks J, Haymart MR, Kloos RT, Seals B, Schreibstein JM, Thomas MA, Waddington C, Warren B, Robertson PJ, American Academy of Otolaryngology-Head, and Neck Surgery. Clinical practice guideline: improving voice outcomes after thyroid surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013;148(6 Suppl):S1-37.

21. Cheetham J, Perkins JD, Jarvis JC, Cercone M, Maw M, Hermanson JW, Mitchell LM, Piercy RJ, Ducharme NG. Effects of functional electrical stimulation on denervated laryngeal muscle in a large animal model. *Artif Organs*. 2015;39(10):876-85.
22. Chrobok V, Komínek P, Plzák J, Čelakovský Petr, Zeleník K et al. *Otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku*. 1st ed. Havlíčkův Brod, Czech Republic: Tobiáš. 2022. ISBN 978-80-7311-205-9.
23. DE Corso E, Fiorita A, Rizzotto G, Mennuni GF, Meucci D, Giuliani M, Marchese MR, Levantesi L, Della Marca G, Paludetti G, Scarano E. The role of drug-induced sleep endoscopy in the diagnosis and management of obstructive sleep apnoea syndrome: our personal experience. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2013;33(6):405-13.
24. de Lima MAP, Neto PJN, Lima LPM, Gonçalves Júnior J, Teixeira Junior AG, Teodoro IPP, Facundo HT, da Silva CGL, Lima MVA. Association between Epstein-Barr virus (EBV) and cervical carcinoma: A meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2018;148(2):317-328.
25. De Vito A, Carrasco Llatas M, Vanni A, Bosi M, Braghiroli A, Campanini A, de Vries N, Hamans E, Hohenhorst W, Kotecha BT, Maurer J, Montevecchi F, Piccin O, Sorrenti G, Vanderveken OM, Vicini C. European position paper on drug-induced sedation endoscopy (DISE). *Sleep Breath*. 2014;18(3):453-65.
26. Dedo HH, Yu KC. CO2 laser treatment in 244 patients with respiratory papillomas. *Laryngoscope* 2001;111(9):1639–44.
27. Drop B, Strycharz-Dudziak M, Kliszczewska E, Polz-Dacewicz M. Coinfection with Epstein-Barr Virus (EBV), Human Papilloma Virus (HPV) and Polyoma BK Virus (BKPyV) in laryngeal, oropharyngeal and oral cavity cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18:E2752.
28. Dy F, Amirault J, Mitchell PD, Rosen R. Salivary Pepsin Lacks Sensitivity as a Diagnostic Tool to Evaluate Extraesophageal Reflux Disease. *J Pediatr*. 2016;177:53-8.
29. Fedorová K, Zeleník K, Formánek M, Židlík V, Komínek P. Chondrosarcoma of the Thyroid Cartilage Successfully Treated with Partial Resection of the Thyroid Cartilage. *Ear Nose Throat J*. 2021 Jun 6:1455613211014109. doi: 10.1177/01455613211014109. Epub ahead of print. PMID: 34092079.
30. Filho FSA, Santiago LH, Fernandes ACN, Korn GP, Pontes PAL, Camponês do Brasil OO. Preliminary Correlation of the Immunoexpression of Cathepsin B and E-Cadherin Proteins in Vocal Fold Leukoplakia. *J Voice*. 2021;S0892-1997(21)00279-4.
31. Formánek M, Zeleník K, Dvořáčková J, Komínek P. Chondrosarkom prstencové chrupavky. *Otorinolaryng. a Foniatick. /Prague/* 2013;62(3):136-9.

32. Formánek M, Komínek P, Matoušek P, Tomanova R, Urban O, Zeleník K. Comparison of Three Methods Used in the Diagnosis of Extraesophageal Reflux in Children with Chronic Otitis Media with Effusion. *Gastroenterol Res Pract.* 2015;2015:547959.
33. Formánek M. Respirační papilomatóza - nové rizikové faktory [online]. Brno, 2017 [cit. 2022-01-05]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/hxj7m/>. Disertační práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Ivo Šlapák.
34. Formánek M, Jančatová D, Tomanová R, Komínek P, Zeleník K. Comparison of Impedance and Pepsin Detection in the Laryngeal Mucosa to Determine Impedance Values that Indicate Pathological Laryngopharyngeal Reflux. *Clinical and Translational Gastroenterology.* 2017;8,e123; doi:10.1038/ctg.2017.49
35. Formánek M. Respirační papilomatóza - nové rizikové faktory [online]. Brno, 2017 [cit. 2022-10-26]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/hxj7m/>. Disertační práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Ivo Šlapák.
36. Formánek M, Zeleník K, Komínek P. Zduření na krku u dospělých – kdy myslet na malignitu? *Medicína pro praxi.* 2019;16(1):53-5.
37. Formánek M, Formánková D, Hurník P, Vrtková A, Komínek P. Epstein-Barr virus may contribute to the pathogenesis of adult-onset recurrent respiratory papillomatosis: A preliminary study. *Clinical Otolaryngology.* 2021;46(2):373-9.
38. Formánek M, Zeleník K, Staníková L, Chlábek R. Příručka pro praxi: Recidivující respirační papilomatóza. 1st ed, Praha, Czech Republic: Merck. 2021. ISBN 978-80-87837-27-6.
39. Formánek M, Zeleník K, Staníková L, Jor O. Příručka pro praxi: Přímá laryngoskopie. 1st ed, Praha, Czech Republic: Merck. 2021. ISBN 978-80-87837-26-9.
40. Formánek M, Zeleník K et al. Respirační papilomatóza. 1st ed. Havlíčkův Brod, Czech Republic: Tobiáš. 2022. ISBN 978-80-7311-207-3.
41. Formánek M, Zeleník K. Přímá laryngoskopie. In: Chrobok V, Komínek P, Plzák J, Čelakovský Petr, Zeleník K. *Otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku.* 1st ed. Havlíčkův Brod, Czech Republic: Tobiáš. 2022. ISBN 978-80-7311-205-9.
42. Franco RA Jr, Zeitels SM, Farinelli WA, Faquin W, Anderson RR. 585-nm pulsed dye laser treatment of glottal dysplasia. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003;112(9 Pt 1):751-8.
43. Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(18):1500-10.

44. Gale N, Zidar N, Poljak M, Cardesa A. Current views and perspectives on classification of squamous intraepithelial lesions of the head and neck. *Head Neck Pathol.* 2014;8(1):16-23.
45. Gallagher TQ, Derkay CS. Pharmacotherapy of recurrent respiratory papillomatosis: an expert opinion. *Expert Opin Pharmacother.* 2009;10(4):645-55.
46. Galloway DA, Gewin LC, Myers H, Luo W, Grandori C, Katzenellenbogen RA, McDougall JK. Regulation of telomerase by human papillomaviruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005;70:209-15.
47. Ganti K, Broniarczyk J, Manoubi W, Massimi P, Mittal S, Pim D, Szalmas A, Thatte J, Thomas M, Tomaić V, Banks L. The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy. *Viruses.* 2015;7(7):3530-51.
48. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009–2010. *JAMA.* 2012;307(7):693–703.
49. Gluvajić D, Šereg-Bahar M, Jerin A, Janša R, Hočevvar-Boltežar I. The Impact of Laryngopharyngeal Reflux on Occurrence and Clinical Course of Recurrent Respiratory Papillomatosis. *Laryngoscope.* 2022;132(3):619-625.
50. Hayat JO, Gabieta-Somnez S, Yazaki E, Kang JY, Woodcock A, Dettmar P, Mabary J, Knowles CH, Sifrim D. Pepsin in saliva for the diagnosis of gastro-oesophageal reflux disease. *Gut.* 2015;64(3):373-80.
51. Hellquist H, Ferlito A, Mäkitie AA, Thompson LDR, Bishop JA, Agaimy A, Hernandez-Prera JC, Gnepp DR, Willems SM, Slootweg PJ, Rinaldo A. Developing Classifications of Laryngeal Dysplasia: The Historical Basis. *Adv Ther.* 2020;37(6):2667-2677.
52. Henry BM, Pękala PA, Sanna B, Vikse J, Sanna S, Saganiak K, Tomaszewska IM, Tubbs RS, Tomaszewski KA. The Anastomoses of the Recurrent Laryngeal Nerve in the Larynx: A Meta-Analysis and Systematic Review. *J Voice.* 2017;31(4):495-503.
53. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Münger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W, Crum CP. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(26):10516-21.
54. Hirano M. *Clinical Examination of Voice.* New York (NY): Springer-Verlag 1981, 100s. ISSN 0173-170X.
55. Holland BW, Koufman JA, Postma GN, McGuirt WF Jr. Laryngopharyngeal reflux and laryngeal web formation in patients with pediatric recurrent respiratory papillomas. *Laryngoscope.* 2002;112(11):1926-9.

56. Holler T, Allegro J, Chadha NK, Hawkes M, Harrison RV, Forte V, Campisi P. Voice outcomes following repeated surgical resection of laryngeal papillomata in children. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;141(4):522-6.
57. Holzinger D, Wichmann G, Baboci L, Michel A, Höfler D, Wiesenfarth M, Schroeder L, Boscolo-Rizzo P, Herold-Mende C, Dyckhoff G, Boehm A, Del Mistro A, Bosch FX, Dietz A, Pawlita M, Waterboer T. Sensitivity and specificity of antibodies against HPV16 E6 and other early proteins for the detection of HPV16-driven oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2017;140(12):2748-57.
58. Hoppo T, Sanz AF, Nason KS et al. How Much Pharyngeal Exposure Is “Normal”? Normative Data for Laryngopharyngeal Reflux Events Using Hypopharyngeal Multichannel Intraluminal Impedance (HMII). *J Gastrointest Surg.* 2012;16(1):16-25.
59. Hránková V, Štembírek J, Ščerbová A, Formánek M, Zeleník K, Komínek P. Poškození zubů v důsledku mimojícnového refluxu. *Česká stomatologie / Praktické zubní lékařství* 2022;122(4):113-120.
60. Ilmarinen T, Munne P, Hagström J, Haglund C, Auvinen E, Virtanen EI, Haesevoets A, Speel EJM, Aaltonen LM. Prevalence of high-risk human papillomavirus infection and cancer gene mutations in nonmalignant tonsils. *Oral Oncol.* 2017;73:77-82.
61. Inoue H, Rey JF, Lightdale C. Lugol chromoendoscopy for esophageal squamous cell cancer. *Endoscopy.* 2001;33(1):75-9.
62. Isenberg JS, Crozier DL, Dailey SH. Institutional and comprehensive review of laryngeal leukoplakia. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2008;117(1):74-9.
63. Ivancic R, Iqbal H, deSilva B, Pan Q, Matrká L. Current and future management of recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 2018;3(1):22-34.
64. Jalouli J, Jalouli MM, Sapkota D, Ibrahim SO, Larsson PA, Sand L. Human papilloma virus, herpes simplex virus and epstein barr virus in oral squamous cell carcinoma from eight different countries. *Anticancer Res.* 2012;32(2):571-80.
65. Javorská Z, Zeleník K, Lukáčová K, Taimrová R, Vrtková A, Hránková V, Lubojacký J, Formánek M, Tedla M. Mulberry Posterior Inferior Nasal Turbinate Is Associated with a Lower Pharyngeal pH Environment. *Laryngoscope.* 2023. doi: 10.1002/lary.30766. Epub ahead of print. PMID: 37246719.
66. Jeannon JP, Orabi AA, Bruch GA, Abdalsalam HA, Simo R. Diagnosis of recurrent laryngeal nerve palsy after thyroidectomy: a systematic review. *Int J Clin Pract.* 2009;63(4):624-9.

67. Jiang A, Liang M, Su Z, Chai L, Lei W, Wang Z, Wang A, Wen W, Chen M. Immunohistochemical detection of pepsin in laryngeal mucosa for diagnosing laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope*. 2011;121(7):1426-30.
68. Jiang R, Ekshyyan O, Moore-Medlin T, Rong X, Nathan S, Gu X, Abreo F, Rosenthal EL, Shi M, Guidry JT, Scott RS, Hutt-Fletcher LM, Nathan CA. Association between human papilloma virus/Epstein-Barr virus coinfection and oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2015;44(1):28-36.
69. Johnston D, Hall H, DiLorenzo TP, Steinberg BM. Elevation of the epidermal growth factor receptor and dependent signaling in human papillomavirus-infected laryngeal papillomas. *Cancer Res*. 1999 Feb 15;59(4):968-74.
70. Johnston N, Dettmar PW, Bishwokarma B, Lively MO, Koufman JA. Activity/stability of human pepsin: implications for reflux attributed laryngeal disease. *Laryngoscope*. 2007;117(6):1036-9.
71. Johnston N, Yan JC, Hoekzema CR, Samuels TL, Stoner GD, Blumin JH, Bock JM. Pepsin promotes proliferation of laryngeal and pharyngeal epithelial cells. *Laryngoscope*. 2012;122(6):1317-25.
72. Karamzadeh AM, Wong BJ, Crumley RL, Ahuja G. Lasers in pediatric airway surgery: current and future clinical applications. *Lasers Surg Med*. 2004;35(2):128-34.
73. Karatayli-Ozgursoy S, Bishop JA, Hillel A, Akst L, Best SR. Risk Factors for Dysplasia in Recurrent Respiratory Papillomatosis in an Adult and Pediatric Population. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2016;125(3):235-41.
74. Kelly EA, Samuels TL, Johnston N. Chronic pepsin exposure promotes anchorage-independent growth and migration of a hypopharyngeal squamous cell line. *Otolaryngology—head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2014;150(4):618–24.
75. Kerr DA, Arora KS, Mahadevan KK, Hornick JL, Krane JF, Rivera MN, Ting DT, Deshpande V, Faquin WC. Performance of a Branch Chain RNA In Situ Hybridization Assay for the Detection of High-risk Human Papillomavirus in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(12):1643-52.
76. Kezirian EJ, Hohenhorst W, de Vries N. Drug-induced sleep endoscopy: the VOTE classification. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011;268(8): 1233–6.
77. Koufman JA. The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GERD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-hour pH monitoring

- and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. *Laryngoscope*. 1991;101(4 Pt 2 Suppl 53):1–78.
78. Kridin K, Zelber-Sagi S, Comaneshter D, Cohen AD. Coexistent Solid Malignancies in Pemphigus: A Population-Based Study. *JAMA Dermatol*. 2018;154(4):435-440.
 79. Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *New Engl J Med*. 2000;45(12):2367–8.
 80. Lachanas VA, Prokopakis EP, Mpenakis AA, Karatzanis AD, Velegarakis GA. The use of Ligasure Vessel Sealing System in thyroid surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;132(3):487-9.
 81. Lebastchi AH, Donovan PI, Udelsman R. Paradigm shift in the surgical management of multigland parathyroid hyperplasia: an individualized approach. *JAMA Surg*. 2014;149(11):1133-7.
 82. Lechien JR, Saussez S, Harmegnies B, Finck C, Burns JA. Laryngopharyngeal reflux and voice disorders: a multifactorial model of etiology and pathophysiology. *J Voice*. 2017;31(6):733–52.
 83. Lechien JR, Burns JA, Akst LM. The Use of 532-Nanometer-Pulsed Potassium-Titanyl-Phosphate (KTP) Laser in Laryngology: A Systematic Review of Current Indications, Safety, and Voice Outcomes. *Ear Nose Throat J*. 2021;100(1_suppl):4S-13S.
 84. Lechien JR, Bobin F, Muls V, Horoi M, Thill MP, Dequanter D, Finck C, Rodriguez A, Saussez S. Saliva Pepsin Concentration of Laryngopharyngeal Reflux Patients Is Influenced by Meals Consumed Before the Samples. *Laryngoscope*. 2021;131(2):350-359.
 85. Lee DJ, Chin CJ, Hong CJ, Perera S, Witterick IJ. Outpatient versus inpatient thyroidectomy: A systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2018;40(1):192-202.
 86. Li SL, Wang W, Zhao J, Zhang FZ, Zhang J, Ni X. A review of the risk factors associated with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis: genetic, immune and clinical aspects. *World J Pediatr*. 2022;18(2):75-82.
 87. Lie ES, Engh V, Boysen M, Clausen OP, Kvernfold H, Stenersen TC, Winther FO. Squamous cell carcinoma of the respiratory tract following laryngeal papillomatosis. *Acta Otolaryngol*. 1994;114(2):209-12.
 88. Low J, Reed A. *Electrotherapy explained*, 3rd edn. Butterworth-Heinemann, Oxford 2000.
 89. Makielski KR, Lee D, Lorenz LD, Nawandar DM, Chiu YF, Kenney SC, Lambert PF. Human papillomavirus promotes Epstein-Barr virus maintenance and lytic reactivation in immortalized oral keratinocytes. *Virology*. 2016;495:52-62.

90. Mallur PS, Rosen CA. Vocal fold injection: review of indications, techniques, and materials for augmentation. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2010;3(4):177-82.
91. Mangino G, Chiantore MV, Iuliano M, Fiorucci G, Romeo G. Inflammatory microenvironment and human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;30:103-11.
92. Marino M, Spencer H, Hohmann S, Bodenner D, Stack BC Jr. Costs of outpatient thyroid surgery from the University Health System Consortium (UHC) database. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;150(2):762–9.
93. Marsico M, Mehta V, Chastek B, Liaw KL, Derkay C. Estimating the incidence and prevalence of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis in publicly and privately insured claims databases in the United States. *Sex Transm Dis*. 2014;41(5):300-5.
94. Masárová M, Seko J, Plášek M, Formánek M, Jor O, Novák V, Komínek P, Matoušek P. Význam spánkové endoskopie při titraci přetlakové ventilace – první výsledky. *Cesk Slov Neurol N* 2021;84/117(2):183-7.
95. McCann AJ, Samuels TL, Blumin JH, Johnston N. The role of pepsin in epithelial-mesenchymal transition in idiopathic subglottic stenosis. *Laryngoscope*. 2020;130(1):154–158.
96. McKenna M, Brodsky L. Extraesophageal acid reflux and recurrent respiratory papilloma in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2005;69(5):597-605.
97. Murphy C, Norman J. The 20% rule: a simple, instantaneous radioactivity measurement defines cure and allows elimination of frozen sections and hormone assays during parathyroidectomy. *Surgery*. 1999;126(6):1023-8; discussion 1028-9.
98. Nelson SP, Chen EH, Syniar GM, Christoffel KK. Prevalence of Symptoms of Gastroesophageal Reflux During Infancy: A Pediatric Practice-Based Survey. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1997;151(6):569–572.
99. Ni XG, He S, Xu ZG, Gao L, Lu N, Yuan Z, Lai SQ, Zhang YM, Yi JL, Wang XL, Zhang L, Li XY, Wang GQ. Endoscopic diagnosis of laryngeal cancer and precancerous lesions by narrow band imaging. *J Laryngol Otol*. 2011;125(3):288-96.
100. Niu K, Guo C, Teng S, Zhou D, Yu S, Yin W, Wang P, Zhu W, Duan M. Pepsin promotes laryngopharyngeal neoplasia by modulating signaling pathways to induce cell proliferation. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227408.
101. Novakovic D, Cheng AT, Baguley K, Walker P, Harrison H, Soma M, Malloy M, Brotherton JM. Juvenile recurrent respiratory papillomatosis: 10-year audit and Australian prevalence estimates. *Laryngoscope*. 2016;126(12):2827-32.

102. Novakovic D, Cheng ATL, Zurynski Y, Booy R, Walker PJ, Berkowitz R, Harrison H, Black R, Perry C, Vijayasekaran S, Wabnitz D, Burns H, Tabrizi SN, Garland SM, Elliott E, Brotherton JML. A Prospective Study of the Incidence of Juvenile-Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis After Implementation of a National HPV Vaccination Program. *J Infect Dis*. 2018;217(2):208-12.
103. Numans ME, Lau J, de Wit NJ, Bonis PA. Short-term treatment with proton-pump inhibitors as a test for gastroesophageal reflux disease: A meta-analysis of diagnostic test characteristics. *Ann Intern Med*. 2004;140(7):518-27.
104. Oelschläger BK, Quiroga E, Isch JA, Cuenca-Abente F. Gastroesophageal and pharyngeal reflux detection using impedance and 24-hour pH monitoring in asymptomatic subjects: defining the normal environment. *J Gastrointest Surg*. 2006;10(1):54-62.
105. Omland T, Akre H, Vårdal M, Brøndbo K. Epidemiological aspects of recurrent respiratory papillomatosis: a population-based study. *Laryngoscope*. 2012;122(7):1595-9.
106. Palmer E, Newcombe RG, Green AC, Kelly C, Noel Gill O, Hall G, Fiander AN, Pirotte E, Hibbitts SJ, Homer J, Powell NG. Human papillomavirus infection is rare in nonmalignant tonsil tissue in the UK: implications for tonsil cancer precursor lesions. *Int J Cancer*. 2014;135(10):2437-43.
107. Palomares-Marin J, Govea-Camacho LH, Araujo-Caballero V, Cazarez-Navarro G, Rodriguez-Preciado SY, Ortiz-Hernandez E, Martinez-Lopez E, Muñoz-Valle JF, Hernandez-Cañaveral II. Association between the TAP1 gene polymorphisms and recurrent respiratory papillomatosis in patients from Western Mexico: A pilot study. *J Clin Lab Anal*. 2021;35(4):e23712.
108. Parker LA, Kunduk M, Blouin D, Adkins L, McWhorter AJ. Voice Outcomes Following Multiple Surgeries for Recurrent Respiratory Papillomatosis. *J Voice*. 2020;34(5):791-8.
109. Parsel SM, Iarocci AL, Gastañaduy M, Winters RD, Marino JP, McCoul ED. Reflux Disease and Laryngeal Neoplasia in Nonsmokers and Nondrinkers. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2020;163(3):560-562.
110. Peretti G, Piazza C, Balzanelli C, Mensi MC, Rossini M, Antonelli AR. Preoperative and postoperative voice in Tis-T1 glottic cancer treatment by endoscopic cordectomy: an additional issue for patient counseling. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003;112:759–63.
111. Piazza C, Dessouky O, Peretti G, Cocco D, De Benedetto L, Nicolai P. Narrow-band imaging: a new tool for evaluation of head and neck squamous cell carcinomas. Review of the literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2008;28(2):49-54.

112. Polz-Gruszka D, Morshed K, Jarzyński A, Polz-Dacewicz M. Prevalence of Polyoma BK Virus (BKPyV), Epstein-Barr Virus (EBV) and Human Papilloma Virus (HPV) in Oropharyngeal Cancer. *Pol J Microbiol.* 2015;64(4):323-8.
113. Prigge ES, Arbyn M, von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M. Diagnostic accuracy of p16^{INK4a} immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2017;140(5):1186-98.
114. Puxeddu R, Sionis S, Gerosa C, Carta F. Enhanced contact endoscopy for the detection of neoangiogenesis in tumors of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope.* 2015;125(7):1600-6.
115. Qureishi A, Ali M, Fraser L, Shah KA, Møller H, Winter S. Saliva testing for human papilloma virus in oropharyngeal squamous cell carcinoma: A diagnostic accuracy study. *Clin Otolaryngol.* 2018;43(1):151-157.
116. Rahbar R, Vargas SO, Folkman J, McGill TJ, Healy GB, Tan X, Brown LF. Role of vascular endothelial growth factor-A in recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005;114(4):289-295.
117. Remacle M, Lawson G, Watelet JB. Carbon dioxide laser microsurgery of benign vocal fold lesions: indications, techniques, and results in 251 patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1999;108(2):156-64.
118. Rintala MA, Grénman SE, Järvenkylä ME, Syrjänen KJ, Syrjänen SM. High-risk types of human papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: experience from the Finnish HPV Family Study. *Clin Infect Dis.* 2005;41(12):1728-33.
119. Roh JL, Kim DH, Kim SY, Park CI. Quality of life and voice in patients after laser cordectomy for Tis and T1 glottic carcinomas. *Head Neck.* 2007;29(11):1010–1016.
120. Rosato L, Avenia N, Bernante P, De Palma M, Gulino G, Nasi PG, Pelizzo MR, Pezzullo L. Complications of thyroid surgery: analysis of a multicentric study on 14,934 patients operated on in Italy over 5 years. *World J Surg.* 2004;28(3):271-6.
121. Rosen CA, Gartner-Schmidt J, Casiano R, Anderson TD, Johnson F, Remacle M, Sataloff RT, Abitbol J, Shaw G, Archer S, Zraick RI. Vocal fold augmentation with calcium hydroxylapatite: twelve-month report. *Laryngoscope.* 2009 May;119(5):1033-41.
122. Rotnáglóvá E, Tachezy R, Saláková M, Procházká B, Košl'abová E, Veselá E, Ludvíková V, Hamšíková E, Klozar J. HPV involvement in tonsillar cancer: prognostic significance and clinically relevant markers. *Int J Cancer.* 2011;129(1):101-10.

- 123.Samuels TL, Altman KW, Gould JC, Kindel T, Bosler M, MacKinnon A, Hagen CE, Johnston N. Esophageal pepsin and proton pump synthesis in barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Laryngoscope*. 2019;129(12):2687-2695.
- 124.San Giorgi MR, van den Heuvel ER, Tjon Pian Gi RE, Brunings JW, Chirila M, Friedrich G, Golusinski W, Graupp M, Horcasitas Pous RA, Ilmarinen T, Jackowska J, Koelmel JC, Ferran Vilà F, Weichbold V, Wierzbicka M, Dikkers FG. Age of onset of recurrent respiratory papillomatosis: a distribution analysis. *Clin Otolaryngol*. 2016;41(5):448-53.
- 125.Scatolini ML, Cocciaglia A, Pérez CG, Rodríguez HA. Laryngeal reconstruction in children with recurrent respiratory papillomatosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2018;115:120-4.
- 126.Scatolini ML, Labedz G, Cocciaglia A, Pérez CG, Nieto ME, Rodríguez D Águila M, Rodríguez HA. Laryngeal sequelae secondary to surgical treatment for recurrent respiratory papillomatosis in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2020;130:109815.
- 127.Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Jones TM, Ma XJ, Wang H, Bui S, Luo Y, Sloan P, Shaw RJ, Robinson M. Validation of a novel diagnostic standard in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2013;108(6):1332-9.
- 128.Seedat RY, Schall R. Age of diagnosis, incidence and prevalence of recurrent respiratory papillomatosis-A South African perspective. *Clin Otolaryngol*. 2018;43(2):533-7.
- 129.Sidell DR, Balakrishnan K, Best SR, Zur K, Buckingham J, De Alarcon A, Baroody FM, Bock JM, Boss EF, Bower CM, Campisi P, Chen SF, Clarke JM, Clarke KD, Cocciaglia A, Cotton RT, Cuestas G, Davis KL, DeFago VH, Dikkers FG, Dossans I, Florez W, Fox E, Friedman AD, Grant N, Hamdi O, Hogikyan ND, Johnson K, Johnson LB, Johnson RF, Kelly P, Klein AM, Lawlor CM, Leboulanger N, Levy AG, Lam D, Licameli GR, Long S, Lott DG, Manrique D, McMurray JS, Meister KD, Messner AH, Mohr M, Mudd P, Mortelliti AJ, Novakovic D, Ongkasuwan J, PLPR S, Piersiala K, Prager JD, Pransky SM, Preciado D, Raynor T, Rinkel RNPM, Rodriguez H, Rodríguez VP, Russell J, Scatolini ML, Scheffler P, Smith DF, Smith LP, Smith ME, Smith RJH, Sorom A, Steinberg A, Stith JA, Thompson D, Thompson JW, Varela P, White DR, Wineland AM, Yang CJ, Zdanski CJ, Derkay CS. Systemic Bevacizumab for Treatment of Respiratory Papillomatosis: International Consensus Statement. *Laryngoscope*. 2021;131(6):E1941-E1949.
- 130.Silverberg MJ, Thorsen P, Lindeberg H, Grant LA, Shah KV. Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol*. 2003;101(4):645-652.

- 131.Simonidesová S, Hamšíková E, Klozar J, Tachezy R. The prevalence of oral HPV infection in healthy populations: A systematic review with a focus on European populations. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2018;67(4):175-183.
- 132.Souza RF. From Reflux Esophagitis to Esophageal Adenocarcinoma. *Digestive diseases.* 2016;34(5):483–90.
- 133.Spyridoulas A, Lillie S, Vyas A, Fowler SJ. Detecting laryngopharyngeal reflux in patients with upper airways symptoms: Symptoms, signs or salivary pepsin? *Respir Med.* 2015;109(8):963-9.
- 134.Stack BC Jr, Spencer HJ, Lee CE, Medvedev S, Hohmann SF, Bodenner DL. Characteristics of inpatient thyroid surgery at US academic and affiliated medical centers. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;146(2):210-9.
- 135.Staníková L. Využití nových endoskopických metod v diagnostice patologických lézí v oblasti hrtanu a hypofaryngu. Olomouc, 2018. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Pavel Komínek.
- 136.Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(2):215-22.
- 137.Starling N, Cunningham D. Monoclonal antibodies against vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor in advanced colorectal cancers: present and future directions. *Curr Opin Oncol.* 2004;16(4):385-90.
- 138.Steurer M, Passler C, Denk DM, Schneider B, Niederle B, Bigenzahn W. Advantages of recurrent laryngeal nerve identification in thyroidectomy and parathyroidectomy and the importance of preoperative and postoperative laryngoscopic examination in more than 1000 nerves at risk. *Laryngoscope.* 2002;112(1):124-33.
- 139.Švec JG, Lejska M, Frostová J, Zábrodský M, Dršata J, Král P. Česká verze dotazníku Voice Handicap Index pro kvantitativní hodnocení hlasových potíží vnímaných pacientem. *Otorinolaryng. a Foniatic. /Prague/* 2009;58(3):132-9.
- 140.Tam S, Fu S, Xu L, Krause KJ, Lairson DR, Miao H, Sturgis EM, Dahlstrom KR. The epidemiology of oral human papillomavirus infection in healthy populations: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2018;82:91-99.
- 141.Tan JJ, Wang L, Mo TT, Wang J, Wang MG, Li XP. Pepsin promotes IL-8 signaling-induced epithelial-mesenchymal transition in laryngeal carcinoma. *Cancer Cell Int.* 2019;20:19:64.

142. Torre C, Liu SY, Kushida CA, Nekhendzy V, Huon LK, Capasso R. Impact of continuous positive airway pressure in patients with obstructive sleep apnea during drug-induced sleep endoscopy. *Clin Otolaryngol.* 2017;42(6):1218-23.
143. Treglia G, Sadeghi R, Schalin-Jääntti C, Caldarella C, Ceriani L, Giovanella L, Eisele DW. Detection rate of (99m) Tc-MIBI single photon emission computed tomography (SPECT)/CT in preoperative planning for patients with primary hyperparathyroidism: A meta-analysis. *Head Neck.* 2016;38 (Suppl. 1), E2159–E2172.
144. Turunen A, Rautava J, Grénman R, Syrjänen K, Syrjänen S. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNAs (EBERs) associated with poor prognosis of head and neck carcinomas. *Oncotarget.* 2017;8(16):27328-38.
145. Tzellos S, Farrell PJ. Epstein-Barr virus sequence variation-biology and disease. *Pathogens.* 2012;1:156-74.
146. Vaezi MF. Debate: Treatment of Chronic Throat Symptoms with PPIs Should Be Preceded by pH Monitoring. CON: Treatment with PPIs Should NOT Be Preceded by pH Monitoring in Patients Suspected of Laryngeal Reflux. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(1):6-11.
147. Valencia C, Bonilla-Delgado J, Oktaba K, Ocádiz-Delgado R, Gariglio P, Covarrubias L. Human papillomavirus E6/E7 oncogenes promote mouse ear regeneration by increasing the rate of wound re-epithelization and epidermal growth. *J Invest Dermatol.* 2008;128(12):2894-903.
148. Vancurova I, Wu R, Miskolci V, Sun S. Increased p50/p50 NF-κB activation in human papillomavirus type 6- or type 11-induced laryngeal papilloma tissue. *J Virol.* 2002;76(3):1533-6.
149. Vilaseca I, Huerta P, Blanch JL, Fernández-Planas AM, Jiménez C, Bernal-Sprekelsen M. Voice quality after CO2 laser cordectomy – what can we really expect? *Head Neck.* 2008;30(1):43–9.
150. Warner MA, Warner ME, Weber JG. Clinical significance of pulmonary aspiration during the perioperative period. *Anesthesiology.* 1993;78(1):56-62.
151. Weitzendorfer M, Antoniou SA, Schredl P, Witzel K, Weitzendorfer IC, Majerus A, Emmanuel K, Koch OO. Pepsin and oropharyngeal pH monitoring to diagnose patients with laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope.* 2020;130(7):1780-6.
152. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet.* 2001;357(9267):1513-8.
153. World Health Organisation. WHO Classification of Tumours Online. Dostupné z: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/52>

154. Wu R, Abramson AL, Shikowitz MJ, Dannenberg AJ, Steinberg BM. Epidermal growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated through phosphatidylinositol-3 kinase, not mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase, in recurrent respiratory papillomas. *Clin Cancer Res.* 2005;11(17):6155-61.
155. Wu R, Coniglio SJ, Chan A, Symons MH, Steinberg BM. Up-regulation of Rac1 by epidermal growth factor mediates COX-2 expression in recurrent respiratory papillomas. *Mol Med.* 2007;13(3-4):143-50.
156. Xi Y, Wang H, Wang W, Wang X, Zhang J, Zhao J, Wang G, Gui J, Ni X. Risk factors for aggressive recurrent respiratory papillomatosis in Chinese juvenile patients. *Acta Otolaryngol.* 2020;140(9):779-784.
157. Yadlapati R, Adkins C, Jaiyeola DM, Lidder AK, Gawron AJ, Tan BK, Shabeeb N, Price CP, Agrawal N, Ellenbogen M, Smith SS, Bove M, Pandolfino JE. Abilities of Oropharyngeal pH Tests and Salivary Pepsin Analysis to Discriminate Between Asymptomatic Volunteers and Subjects With Symptoms of Laryngeal Irritation. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016 Apr;14(4):535-42.e2
158. Zeitels SM, Barbu AM, Landau-Zemer T, Lopez-Guerra G, Burns JA, Friedman AD, Freeman MW, Halvorsen YD, Hillman RE. Local injection of bevacizumab (Avastin) and angiolytic KTP laser treatment of recurrent respiratory papillomatosis of the vocal folds: a prospective study. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2011;120(10):627-34.
159. Zeleník K, Čáp P, Chlumský J, Vitek P et al. *Mimojícnové projevy refluxní choroby.* 1st ed. Havlíčkův Brod, Czech Republic: Tobiáš. 2013. ISBN 978-80-7311-138-0.
160. Zeleník K, Matoušek P, Formánek M, Urban O, Komínek P. Patients with chronic rhinosinusitis and simultaneous bronchial asthma suffer from significant extraesophageal reflux *Int Forum Allergy Rhinol.* 2015;5(10):944-9.
161. Zeleník K, Dršata J, Formánek M. Hrtan a průdušnice. In: Chrobok V, Komínek P, Plzák J, Čelakovský Petr, Zeleník K. *Otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku.* 1st ed. Havlíčkův Brod, Czech Republic: Tobiáš. 2022. ISBN 978-80-7311-205-9.
162. Zeleník K, Javorská Z, Taimrová R, Vrtková A, Hránková V, Tedla M, Lukáčová K, Lubojacký J, Formánek M, Komínek P. Association Between Inferior Turbinate Hypertrophy and Extraesophageal Reflux. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2022;148(8):773-778.
163. Zhang P, Steinberg BM. Overexpression of PTEN/MMAC1 and decreased activation of Akt in HPV-infected laryngeal papillomas. *Cancer Res.* 2000;60(5):1457-62.

164. Zhang D, Zhou J, Chen B, Zhou L, Tao L. Gastroesophageal reflux and carcinoma of larynx or pharynx: a meta-analysis. *Acta Otolaryngol.* 2014;134(10):982-9.
165. Zhao Y, Cao X, Zheng Y, Tang J, Cai W, Wang H, Gao Y, Wang Y. Relationship between cervical disease and infection with human papillomavirus types 16 and 18, and herpes simplex virus 1 and 2. *J Med Virol.* 2012;84(12):1920-7.
166. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1288(2):F55-78.
167. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(5):342-50.

6 PŘÍLOHY

Příloha 1: FORMANEK, M. *(corresponding author)*, D. JANCATOVA, P. KOMINEK, P. MATOUSEK a K. ZELENIK. Laryngopharyngeal reflux and herpes simplex virus type 2 are possible risk factors for adult-onset recurrent respiratory papillomatosis (prospective case-control study). *Clinical Otolaryngology* [online]. 2017, 42(3), 597–601. ISSN 1749-4478. Dostupné z: doi:10.1111/coa.12779. (IF 2017 = 2,696; Q1)

Laryngopharyngeal reflux and herpes simplex virus type 2 are possible risk factors for adult-onset recurrent respiratory papillomatosis (prospective case-control study)

Formánek, M.,*† Jančátová, D.,*† Komínek, P.,*† Matoušek, P.*† & Zeleník, K.*†

*Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, University Hospital Ostrava, †Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

Accepted for publication 16 October 2016
Clin. Otolaryngol. 2017, 42, 597–601

Objective: The human papillomavirus (HPV) causes recurrent respiratory papillomatosis (RRP). Although HPV prevalence is high, the incidence of papillomatosis is low. Thus, factors other than HPV infection probably contribute to RRP. This study investigated whether patients with papillomatosis are more often infected with herpes simplex virus type 2 and chlamydia trachomatis (ChT) and whether laryngopharyngeal reflux (LPR) occurs in this group of patients more often.

Design: Prospective case-control study.

Setting: Department of Otorhinolaryngology of University Hospital.

Participants: The study included 20 patients with adult-onset RRP and 20 adult patients with vocal cord cyst and no pathology of laryngeal mucosa (control group).

Main outcome measures: Immunohistochemical analysis of pepsin, HPV, herpes simplex virus type 2 and ChT was performed in biopsy specimens of laryngeal papillomas and of healthy laryngeal mucosa (control group) obtained from

medial part of removed vocal cord cyst during microlaryngoscopy procedures.

Results: Pathologic LPR (pepsin in tissue) was diagnosed in 8/20 (40.0%) patients with papillomatosis and in 0/20 control patients ($P = .003$). Herpes simplex virus type 2 was present in 9/20 (45.0%) patients with papillomatosis and in 0/20 control patients ($P = .001$). Five specimens were positive for both pepsin and herpes simplex virus type 2. No samples were positive for ChT. There were no significant differences between groups for age, body mass index, diabetes mellitus and gastroesophageal reflux disease. Tobacco exposure was not more frequent in RRP group either ($P = .01$).

Conclusions: Results show that LPR and herpes simplex virus type 2 are significantly more often present in patients with RRP. LPR and herpes simplex virus type 2 might activate latent HPV infection and thereby be possible risk factors for RRP.

Recurrent respiratory papillomatosis (RRP) is a chronic viral disease that affects both children and adults. It is characterized by the growth of squamous cell tumours on the mucosa of the aerodigestive tract, especially on the larynx. RRP is the most common benign neoplasm of the larynx in children and the second most frequent cause of childhood hoarseness. RRP shows an incidence 4.3 per 100 000 children and 1.8 per 100 000 adults in the United States.^{1–3} Although it is a benign disease, RRP has an unpredictable clinical course: it tends to recur and spread, and it can undergo malignant conversion.^{2,4} RRP is categorized as juvenile or adult RRP according to the age of the patient at disease onset.

Recurrent respiratory papillomatosis is caused by the human papillomavirus (HPV); however, in contrast to the relatively low incidence of RRP, asymptomatic HPV in the respiratory tract is common.^{5,6} Therefore, it seems likely that other factors contribute to the pathogenesis of RRP in terms of activating or reactivating HPV.

The aim of this study was to investigate possible risk factors for RRP. We investigated whether patients with RRP more often have herpes simplex virus type 2 (HSV-2) or chlamydia trachomatis (ChT) infections and whether laryngopharyngeal reflux (LPR) occurs in this group of patients more often. To our knowledge, this is the first study to actually investigate these factors as risk factors for RRP.

Correspondence: M. Formánek, Department of Otorhinolaryngology, University Hospital Ostrava, 17. listopadu 1790, Ostrava 70852, Czech Republic. Tel.: +420 597 375 812; fax: +420 597 375 805; e-mail: martin.formanek@fno.cz

in accordance with the Declaration of Helsinki using good clinical practice and following the applicable regulatory requirements. The study was registered at ClinicalTrials.gov under the identifier NCT02592902. Written informed consent was obtained from the patient before initiating any procedure.

Patients 19–84 years old who had been diagnosed with RRP of the larynx and patients with vocal cord cyst and no other pathology of laryngeal mucosa (control group) were included in the study. Only patients with recurrent (at least two times during the previous two years) and histologically confirmed squamous cell papillomas on the laryngeal mucosa were included in the study. The control group consisted of patients with vocal cord cyst who underwent microlaryngoscopy with cyst removal. Healthy mucosa was obtained from medial part of the cyst after its removal.

All patients underwent the same diagnostic tests. The following were excluded: patients with contraindications for general anaesthesia; patients with laryngeal papillomas undergoing microlaryngoscopy for the first time; and patients who did not consent to be included in the study.

Biopsy specimens of laryngeal papillomas and of healthy laryngeal mucosa (control group) were obtained during microlaryngoscopy procedures. Paraffin-embedded sections (2–3 µm thick) were prepared from the biopsy samples (Benchmark XT, Roche, Ventana Medical Systems, Basel, Switzerland) and analysed at the Department of Pathology by a single pathologist. Immunohistochemical analysis was performed after endogenous peroxidase blocking with hydrogen peroxide (Roche) and antigen revitalization by CCI buffer (Roche). A pepsin antibody (NB100-66518, Novus Biologicals, Littleton, Colorado, USA, concentration 1 : 100) was used as the primary antibody to detect pepsin. Rabbit polyclonal antibody herpes simplex virus II (362A-15, Cell Marque, Rocklin, California, USA, 1 : 100 dilution) was used as the primary antibody to detect HSV. A ChT antibody (ILM16710C05, Immunologic, USA, 1 : 10 dilution) was used as the primary antibody to detect ChT. The monoclonal mouse HPV antibody Clone K1H8 (Code M3528, DAKO, Glostrup, Denmark, 1 : 100 dilution) was used as the primary antibody for detecting HPV. The incubation period for the primary antibodies was 32 min. The iView DAB Detection Kit (Roche) was used to visualize the antigens.

Age, body mass index (BMI), tobacco exposure, a history of immunodeficiency, gastroesophageal reflux disease (GERD) or diabetes mellitus, and the presence of HSV-2, pepsin and ChT were compared between the groups. The statistical analysis was performed using Stata 13 software (Stata Corp., College Station, Texas, USA). The following statistical tests were used: Pearson's chi-squared test, and Fisher's exact test. The statistical tests were assessed using a significance level of 5%.

Results

A total of 42 patients were included in the study: 22 patients with laryngeal RRP and 20 patients with healthy laryngeal mucosa. The study was conducted between April 2014 and December 2015. Two patients with RRP were excluded from the study: in one patient, the histological examination resulted in a diagnosis of squamous cell carcinoma; in the other patient, the specimen was very small and immunohistological analysis was not possible. Thus, a total of 20 patients with laryngeal RRP were compared with 20 patients with healthy laryngeal mucosa.

The average age in the RRP group was 42.2 ± 16.33 years, and the average age in the control group was 41.6 ± 16.45 years. There were more men in the RRP group (75%) than in the control group (35%). There were no differences between the groups in terms of age, BMI, history of immunodeficiency, diabetes mellitus or GERD. Tobacco exposure was more frequent in the control group ($P = .01$) (Table 1).

Pathologic LPR (pepsin in mucosa) was present in 8/20 (40.0%) patients with RRP and in 0/20 patients in the control group ($P = .003$). HSV-2 was present in 9/20 (45.0%) patients with RRP and in 0/20 patients in the control group ($P = .001$). Moreover, five specimens from patients with RRP were positive for both pepsin and HSV-2. No biopsy specimen was positive for ChT by immunohistochemical examination (Table 2). HPV was found in all of the biopsies from patients with RRP and in 2/20 (10.0%) patients in the control group.

Discussion

Recurrent respiratory papillomatosis is a chronic viral disease caused by HPV, which infects cells within the basal layer of the mucosa.⁷ This DNA capsid virus was first described in laryngeal papillomas by Gissmann and Mounts.^{1,8} Over 120 types of HPV have been identified

Table 1. Characteristics of the study participants

	RRP group	Control group	P value
Average age \pm SD	42.2 \pm 16.33	41.6 \pm 16.45	.901
Male	15	7	.011
Female	5	13	.011
Average BMI \pm SD	26.2 \pm 5.59	26.8 \pm 5.52	.7297
Immunodeficiency	0	0	–
Diabetes mellitus	2	2	1.000
Tobacco exposure	4	12	.010
GERD	1	4	.342

BMI, body mass index; GERD, gastroesophageal reflux disease; RRP, recurrent respiratory papillomatosis; SD, standard deviation.

Table 2. Analysis of biopsy specimens

	RRP group	Control group	P value
Pepsin	8	0	.003
HSV-2	9	0	.001
ChT	0	0	–

ChT, chlamydia trachomatis; HSV-2, herpes simplex virus-2; RRP, recurrent respiratory papillomatosis.

and grouped based on genetic homology. The groupings correlate with pathophysiology and tissue distribution.⁹ Notably, RRP is caused by HPV types 11 and 6.¹⁰ Specific viral subtypes may correlate with disease severity and clinical course; for example, HPV 11 infection is related to worse course and prognosis.¹¹

However, in contrast to the relatively low incidence of RRP, HPV prevalence is quite high. Szydłowski *et al.* reported that HPV was present in the respiratory tracts of 19.6% of healthy preschool children.⁵ Rintala *et al.*⁶ reported that 10% of healthy children had HPV in their respiratory tracts at their medical check-up at age 3 years. In a large study by Krystle *et al.*, HPV was present in the oral mucosa of 1.9% of healthy women.¹² In a study by Rautava *et al.*,¹³ HPV was present in the oral mucosa of 15.1%–24.1% of women during a six-year follow-up. Similar asymptomatic HPV presence was found in our study as well. Altogether 10% of healthy patients were diagnosed having HPV in their laryngeal mucosa. Therefore, it is likely that factors other than HPV contribute to the pathogenesis of RRP.

Laryngopharyngeal reflux can cause or facilitate many pathologies, such as acute or chronic otitis media, rhinosinusitis and chronic laryngitis.^{14–17} The presence of pepsin in gastric refluxate is considered a main pathogenetic factor that causes proteolysis and cell damage. It is possible that LPR contributes to the development of RRP during HPV infection.

It is very important to use the best diagnostic method for LPR in order to evaluate whether LPR is actually relevant. Although many LPR questionnaires have been developed in the past few years, they do not seem to be the best way to evaluate LPR, as the symptoms of LPR are both heterogeneous and very common.^{18,19} RRP questionnaires are even less suitable because they ask about and score voice problems, which are always present in RRP. Moreover, RRP could cause other symptoms related to reflux, like globus pharyngeus and cough. Therefore, there would be a high risk of false-positive results.

Currently, 24-h oesophageal impedance is considered the best method for diagnosing LPR. However, this method has several disadvantages. It may not be tolerated well, especially in children, and it allows only short-term analysis over a time span of just 24 h. Therefore, measuring pepsin in fluid or tissue samples (even better and more precise) appears to be the most suitable method for evaluating a possible

relationship between pathology and LPR, not only in the larynx but also in the middle ear.¹⁴ The advantage of pepsin detection compared with oesophageal impedance is that pepsin can be detected in tissues and fluids even when reflux has not occurred in the previous several days.¹⁵ Moreover, the presence of pepsin in the cytoplasm of mucosa cells signifies that LPR is relevant. Therefore, this method provides the most accurate data.

Patients with vocal cord cyst with healthy laryngeal mucosa on its medial part were selected for control group. Healthy mucosa was obtained from medial part of the cyst after its removal. Therefore, no side effect from biopsy was seen. Conversely, all patients reported improving of their voice after surgery. There are minor histological differences between papilloma and healthy laryngeal mucosa. However, it should not affect our results.

Pepsin was detected in the cytoplasm of 8/20 patients with RRP and in 0/20 patients in the control group ($P = .003$), even though four patients in the control group had a history of gastrooesophageal reflux disease (not LPR) that was proven by oesophageal pH monitoring. In these four patients, reflux of (duodeno)gastric content above lower oesophageal sphincter was diagnosed. However, reflux did not reach laryngeal mucosa (there was no LPR). It shows, how important is selection of accurate diagnostic method to see whether reflux can affect given tissue and also how essential is to strictly differentiate terms gastrooesophageal reflux disease and LPR.¹⁴ Intracellular presence of pepsin in patients with RRP in our study suggests that LPR could be a possible risk factor for RRP. It can be assumed that LPR could activate latent HPV infection and worsen course of RRP. HPV activation could be caused by chronic irritation and oxidative stress. However, the mechanisms involved need to be revealed. Conversely, possibility of HPV increasing pepsin cell membranes permeability cannot be excluded. However, studies clarifying such a mechanism are missing. In addition, no patient in the control group was positive for intracellular pepsin (including HPV-positive ones).

HSV-2 is considered to be another possible risk factor for RRP. HSV is a member of the Herpesviridae family, which frequently infects humans and causes a range of diseases, from mild uncomplicated mucocutaneous infections to life-threatening infections.²⁰ HSV-2, along with HSV-1, is a serious human pathogen. HSV-1 is generally associated with orofacial infections and encephalitis, whereas HSV-2 usually causes genital infections and can be transmitted from infected mothers to neonates.²⁰ HSV-2 has been implicated as a co-factor in conjunction with HPV for cervical cancer.²¹

HSV has an elaborate system for blocking host responses to infection. It blocks the presentation of peptides and also blocks programmed cell death. In addition, HSV destroys cellular mRNA, inhibits DNA transcription and blocks

mRNA splicing, thereby hindering the cellular response to infection.^{20,22}

HSV-1 presence in aero-digestive tract is common. The presence of HSV-2 in the reproductive system is common, its prevalence in the oral cavity is very low, and its prevalence in the upper respiratory tract and especially in the larynx is not known. In a study by Maki *et al.* of 304 asymptomatic pregnant women, none of the epithelial brush samples collected from the oral cavity were positive for HSV-2, but 11.4% of the samples were positive for HSV-1. However, HSV-1-positive women were almost invariably HPV-negative: only 0.2% of the samples showed HSV-HPV co-infection.²³ A meta-analysis showed that 0.4% of otherwise healthy individuals had asymptomatic shedding of HSV-2 from the oral cavity.²⁴ We can assume that the prevalence of HSV-2 in the larynxes of asymptomatic patients is likely to be very similar to its prevalence in the oral cavity. Indeed, the results of our study confirmed this, since HSV-2 was not detected in any patients in the control group. On the contrary, it was found in 9/20 (45.0%) of the patients with RRP ($P = .001$). This suggests the possibility that HSV-2 co-infection could be a possible risk factor for RRP.

Similarly, possible negative effect of viral co-infection (HSV-1, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus) on HPV-positive laryngeal cancer was reported by Polz-Gruszka *et al.*²⁵ On the other hand, we and also Polz-Gruszka *et al.* cannot surely extrude that HSV-2 other viral presence could be only result of affected local host immune system. Immunohistochemical HSV-2 detection has also its limitation and we cannot surely extrude presence of very small amount of HSV-2 in more samples. However, such positive samples could be in both groups.

Chlamydia trachomatis infection is also considered a possible risk factor for RRP based on gynaecological records. Specifically, infection with ChT increases the risk of infection by carcinogenic genital HPV types, and it may enhance the persistence of some HPV types.²⁶ Alternatively, ChT could increase the susceptibility to genital HPV co-infection or it could impede efficient clearance of an existing HPV genital infection, thereby increasing the chance that cancer develops.^{20,27,28} The prevalence of ChT in the respiratory system is unknown, and it is also unknown whether it could act as a co-factor of RRP. ChT was not detected in any of the RRP patients or in any control patients. It indicates that ChT does not play role in the development of RRP.

Immunodeficiency and smoking are currently considered to be risk factors for RRP. Immunodeficiency and smoking history was not often present in study group when compared with control group, so that we can consider both groups homogenous in this respect. If immunodeficiency and

smoking were present in RRP group more often, there could be higher risk of possible bias of many potential risk factors.

Immune deficiency (local and general) probably plays the most important role in the manifestation of viral infection (such as HPV and also HSV) and development of papillomatosis. However, there still must be present some factors which lead to papilloma formation. Local or general immune deficiency itself does not initiate papilloma growth. And our results suggest HSV-2 and reflux might be such factors because their presence in papillomas is significantly higher when compared with control group.

Conclusion

Patients with RRP more often suffer from LPR and HSV-2 co-infection compared with controls. This suggests that LPR and HSV-2 co-infection might be possible risk factors for RRP. Our data also indicate that ChT does not seem to be a risk factor for RRP. These results must be interpreted with caution, and additional studies with larger cohorts are warranted to confirm these findings and to elucidate the mechanisms involved.

Keypoints

- Patients with RRP more often suffer from LPR compared with controls.
- Patients with RRP are more often co-infected with HSV-2 compared with controls.
- LPR and HSV-2 co-infection might activate latent HPV infection.
- LPR and HSV-2 co-infection might be possible risk factors for RRP.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Author contribution

All those named above are significant contributors to either design, data collection and analysis or interpretation of results. All contributed to the final manuscript.

References

- 1 Mounts P., Shah K.V. & Kashima H. (1982) Viral etiology of juvenile-and adult-onset squamous papilloma of the larynx. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79, 5425–5429

- 2 Derkay C.S. (1995) Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **121**, 1386–1391
- 3 Morgan A.H. & Zitch R.P. (1986) Recurrent respiratory papillomatosis in children: a retrospective study of management and complications. *Ear Nose Throat J.* **65**, 19–28
- 4 Go C., Schwartz M.R. & Donovan D.T. (2003) Molecular transformation of recurrent respiratory papillomatosis: viral typing and p53 overexpression. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **112**, 298–302
- 5 Szydłowski J., Jonczyk-Potoczna K., Pucher B. *et al.* (2014) Prevalence of human papillomavirus (HPV) in upper respiratory tract mucosa in a group of pre-school children. *Ann. Agric. Environ. Med.* **21**, 822–824
- 6 Rintala M.A., Grénman S.E., Järvenkylä M.E. *et al.* (2005) High-risk types of human papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: experience from the Finnish HPV Family Study. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 1728–1733
- 7 Derkay C.S. & Wiatrak B. (2008) Recurrent respiratory papillomatosis: a review. *Laryngoscope* **118**, 1236–1247
- 8 Gissmann L., Diehl V., Schultz-Coulon H.J. *et al.* (1982) Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J. Virol.* **44**, 393–400
- 9 Draganov P., Todorov S., Todorov I. *et al.* (2006) Identification of HPV DNA in patients with juvenile-onset RRP using SYBR real-time PCR. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **70**, 469–473
- 10 Cogliano V., Baan R., Straif K. *et al.* (2005) Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol.* **6**, 204
- 11 Rabah R., Lancaster W.D., Thomas R. *et al.* (2001) Human papillomavirus-11-associated recurrent respiratory papillomatosis is more aggressive than human papillomavirus-6-associated disease. *Pediatr. Dev. Pathol.* **4**, 68–72
- 12 Lang Kuhs K.A., Gonzalez P., Struijk L. *et al.* (2013) Prevalence of and risk factors for oral human papillomavirus among young women in Costa Rica. *J. Infect. Dis.* **208**, 1643–1652
- 13 Rautava J., Willberg J., Louvanto K. *et al.* (2012) Prevalence, genotype distribution and persistence of human papillomavirus in oral mucosa of women: a six-year follow-up study. *PLoS ONE* **7**, e42171
- 14 Formanek M., Kominek P., Matousek P. *et al.* (2015) Comparison of three methods used in the diagnosis of extraesophageal reflux in children with chronic otitis media with effusion. *Gastroenterol. Res. Pract.* **79**, 677–679.
- 15 Jiang A., Liang M., Su Z. *et al.* (2011) Immunohistochemical detection of pepsin in laryngeal mucosa for diagnosing laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope* **121**, 1426–1430
- 16 Crapko M., Kerschner J.E., Syring M. *et al.* (2007) Role of extraesophageal reflux in chronic otitis media with effusion. *Laryngoscope* **117**, 1419–1423
- 17 Zelenik K., Matousek P., Formanek M. *et al.* (2015) Patients with chronic rhinosinusitis and simultaneous bronchial asthma suffer from significant extraesophageal reflux. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **5**, 944–949
- 18 Deal L., Gold B.D., Gremse D.A. *et al.* (2005) Age specific questionnaires distinguish GERD symptom frequency and severity in infants and young children: development and initial validation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **41**, 178–185
- 19 Kleinman L., Nelson S., Kothari-Talwar S. *et al.* (2011) Development and psychometric evaluation of 2 age stratified versions of the pediatric GERD symptom and quality of life questionnaire. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **52**, 514–522
- 20 Whitley R.J. & Roizman B. (2001) Herpes simplex virus infections. *Lancet* **357**, 1513–1518
- 21 Smith J.S., Herrero R., Bosetti C. *et al.* (2002) Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J. Natl Cancer Inst.* **94**, 1604–1613
- 22 Dobbs M.E., Strasser J.E., Chu C.F. *et al.* (2005) Clearance of herpes simplex virus type 2 by CD8+ T cells requires gamma interferon and either perforin- or Fas-mediated cytolytic mechanisms. *J. Virol.* **79**, 14546–14554
- 23 Mäki J., Paavilainen H., Grénman S. *et al.* (2015) Carriage of herpes simplex virus and human papillomavirus in oral mucosa is rare in young women: a long-term prospective follow-up. *J. Clin. Virol.* **70**, 58–62
- 24 Miller C.S. & Danaher R.J. (2008) Asymptomatic shedding of herpes simplex virus (HSV) in the oral cavity. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **105**, 43–50
- 25 Polz-Gruszka D., Stec A., Dworzański J. *et al.* (2015) EBV, HSV, CMV and HPV in laryngeal and oropharyngeal carcinoma in Polish patients. *Anticancer Res.* **35**, 1657–1661
- 26 Vriend H.J., Bogaards J.A., van Bergen J.E.A.M. *et al.* (2015) Incidence and persistence of carcinogenic genital human papillomavirus infections in young women with or without Chlamydia trachomatis co-infection. *Cancer Med.* **4**, 1589–1598
- 27 Safaeian M., Quint K., Schiffman M. *et al.* (2010) Chlamydia trachomatis and risk of prevalent and incident cervical premalignancy in a population-based cohort. *J. Natl Cancer Inst.* **102**, 1794–1804
- 28 Silins I., Ryd W., Strand A. *et al.* (2005) Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. *Int. J. Cancer* **116**, 110–115

Příloha 2: FORMANEK, Martin*(corresponding author)*, Debora FORMANKOVA, Pavel HURNÍK, Adela VRTKOVA a Pavel KOMÍNEK. Epstein-Barr virus may contribute to the pathogenesis of adult-onset recurrent respiratory papillomatosis: A preliminary study. *Clinical Otolaryngology* [online]. 2021, 46(2), 373–379. ISSN 1749-4478. Dostupné z: doi:10.1111/coa.13681. (IF 2020 = 2,597; Q2)

Received: 8 December 2019 | Revised: 27 August 2020 | Accepted: 25 October 2020

DOI: 10.1111/coa.13681

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Epstein-Barr virus may contribute to the pathogenesis of adult-onset recurrent respiratory papillomatosis: A preliminary study

Martin Formánek¹  | Debora Formánková¹ | Pavel Hurník² | Adéla Vrtková^{3,4} | Pavel Komínek^{1,5}

¹Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

²Department of Pathology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

³Department of Applied Mathematics, Faculty of Electrical Engineering and Computer Science, VSB-Technical University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

⁴Department of Deputy Director of Science and Research, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

⁵Department of Craniofacial Surgery, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

Correspondence

Martin Formánek, Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, University Hospital Ostrava, 17 listopadu 1790, 708 52 Ostrava, Czech Republic
Email: martin.formanek@fno.cz

Funding information

Ministerstvo Zdravotnictví České Republiky, Grant/Award Number: DRO (FNOs/2019); Ministry of Health

Abstract

Objective: Human papillomavirus (HPV) causes adult-onset recurrent respiratory papillomatosis (AORRP), but AORRP prevalence is much lower than HPV prevalence. Thus, HPV infection is necessary, but not sufficient, to cause AORRP and other factors likely contribute to its pathogenesis. The present study aimed to investigate whether co-infection with herpetic viruses may contribute to the pathogenesis of AORRP.

Design: Prospective case-control study conducted from January 2018 to November 2019.

Settings: Tertiary referral centre.

Participants: Eighteen consecutive patients with AORRP and 18 adults with healthy laryngeal mucosa (control group) undergoing surgery.

Main outcome measures: Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus (EBV), herpes simplex viruses 1 and 2, human herpesvirus 6, varicella zoster virus and HPV (including genotyping) were detected in biopsies of papilloma or healthy mucosa using real-time polymerase chain reaction and reverse line blot. Dysplasia and Ki67 levels were determined in papilloma specimens.

Results: EBV was present in 6 (33.3%) AORRP patients and no control patients ($P = .019$). Presence was not dependent on tobacco exposure ($P = .413$) or HPV genotype or concentration ($P > .999$). EBV presence was strongly related to increased cell proliferation ($P = .005$) and number of previous surgeries ($P = .039$), but not dysplasia ($P > .999$). Human herpesvirus 6 was found in 3 (16.7%) AORRP biopsies, with one false positive. No other herpetic virus was found.

Conclusions: Unlike other herpetic viruses, EBV seems to interact with HPV, enhancing cell proliferation and contributing to the pathogenesis and progression of AORRP. Further research is required to elucidate specific interactions and their role in the pathogenesis of AORRP.

1 | INTRODUCTION

Recurrent respiratory papillomatosis (RRP) is a chronic viral disease characterised by the exophytic growth of squamous cell tumours on

the mucosa of the aerodigestive tract. The disease is categorised as juvenile or adult RRP according to the age of the patient at disease onset. Although it is a benign disease, RRP has an unpredictable clinical course; it tends to recur and spread, and it can undergo

malignant conversion.^{1,2} RRP is caused by human papillomavirus (HPV) types 6 and 11, which infect cells within the basal layer of the mucosa.^{3,4} HPV 11 positivity is associated with worse disease course and prognosis.⁵

In contrast to the relatively low incidence of RRP, asymptomatic HPV infection is common.⁶⁻¹⁰ The mechanism underlying the progression from HPV infection to RRP is unclear, but it seems likely that other factors contribute to pathogenesis in terms of activating or reactivating HPV. The roles of tobacco exposure and immunodeficiency have been considered, but these risk factors are present in a very small group of patients with RRP.^{8,11,12} In a recent study, herpes simplex virus (HSV) type 2 (HSV-2) co-infection was significantly more frequent in biopsies from patients with adult-onset recurrent respiratory papillomatosis (AORRP) than patients with healthy laryngeal mucosa.⁸ This suggests that HSV-2, and perhaps other herpetic viruses, may be one of the possible risk factors for AORRP contributing to its development in terms of the activation of latent HPV infection. However, less suitable, non-quantitative immunohistochemical detection was used and other herpetic viruses were not detected. The present study aimed to investigate the risk potential of all of the main human herpetic viruses. Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), HSV-1, HSV-2, human herpesvirus 6 (HHV-6) and varicella zoster virus (VZV) were quantitatively detected in biopsies from patients with AORRP and compared to patients with healthy respiratory tract mucosa. To the best of our knowledge, this is the first study to investigate these factors as risk co-factors for AORRP.

2 | METHODS

2.1 | Ethical considerations

This case-control study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital and was performed in accordance with the Declaration of Helsinki using good clinical practice and following the applicable regulatory requirements. The study was registered at ClinicalTrials.gov under the identifier NCT02592902. Written informed consent was obtained from each patient before initiating any procedure. The study was conducted from January 2018 to November 2019 at a tertiary referral hospital.

2.2 | Participants

Adult patients who had been diagnosed with RRP of the larynx were included in the study. Only patients with recurrent (at least one recurrence during the previous 2 years) and histologically confirmed squamous cell papillomas on the laryngeal mucosa were included in the study. The control group consisted of patients with a vocal cord cyst who underwent microlaryngoscopy with cyst removal and had no other pathology of the laryngeal mucosa. Healthy mucosa was

obtained from the abundant part of the mucosal microflap after cyst removal. Patients with contraindications for general anaesthesia, who had laryngeal papillomas undergoing microlaryngoscopy for the first time or who did not consent to be included in the study were excluded.

2.3 | Endoscopy

The extent of the disease was evaluated perioperatively using a 4-mm rigid HD endoscope (Olympus Europa SE & Co., Hamburg, Germany) and 6 months after the surgery at the outpatient clinic using a 2.7-mm flexible HD endoscope (Olympus). The Derkay/Coltera score was used for scoring.¹³

2.4 | Virus detection

Biopsy specimens of the laryngeal papillomas and of healthy laryngeal mucosa (control group) were obtained during microlaryngoscopy. The presence of CMV, EBV, HSV-1, HSV-2, HHV-6 and VZV in the biopsies was detected by real-time polymerase chain reaction (PCR). HPV testing and genotyping was performed using single-step PCR and reverse line blot.

QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used for DNA isolation. The manufacturer's recommended protocol was followed. The GeneProof® CMV PCR Kit (GeneProof a.s., Brno, Czech Republic) was used for CMV detection. This kit has a specificity of 100% and sensitivity (limit of detection) of 122.594 IU/ml with 95% probability (target sequence: specific conservative DNA sequence of a single-copy gene encoding the 4 IE antigen). The GeneProof® EBV PCR Kit was used for EBV detection; it has a specificity of 100% and sensitivity (limit of detection) of 196.088 IU/ml with 95% probability (target sequence: DNA sequence of the single-copy gene encoding the nuclear antigen 1). The GeneProof® HSV-1 PCR Kit was used for HSV-1 detection; it has a specificity of 100% and sensitivity (limit of detection) of 122.124 cp/ml with 95% probability (target sequence: specific conservative DNA sequence of a single-copy gene encoding the glycoprotein B). The GeneProof® HSV-2 PCR Kit was used for HSV-2 detection; it has a specificity of 100% and sensitivity (limit of detection) of 197.215 cp/ml with 95% probability (target sequence: specific conservative DNA sequence of a single-copy gene encoding the glycoprotein B). The AmpliSens® HHV6-screen-titre-FRT PCR kit (InterLabService Ltd., Moscow, Russian Federation) was used for HHV-6 detection; it has a specificity of 100%, sensitivity 400 cp/mlv. The GeneProof® VZV PCR Kit was used for VZV detection; it has a specificity of 100% and sensitivity (limit of detection) of 113.05 cp/ml with 95% probability (target sequence: specific conservative DNA sequence of the single-copy gene ORF62). Ampliquality HPV-Type Express v.3.0 (AB ANALITICA srl., Padova, Italy) was used for HPV testing and genotyping with a diagnostic sensitivity of 99% and specificity of 98.6%. The test allows identification of 40 HPV

TABLE 1 Characteristics of the study participants

	RRP group			Control group			P value
Age, years	46.6 (13.5)			52.4 (12.5)			0.185*
Male	11			6			0.182**
Female	7			12			0.182**
Immunodeficiency	0			1			>0.999***
Diabetes mellitus	0			1			>0.999***
Voice professional	6			5			>0.999***
Allergy	2			1			>0.999***
Tobacco exposure	Yes	Stop	No	Yes	Stop	No	0.741**
	6	3	9	4	3	11	

Note: Data are presented as arithmetic mean (standard deviation [SD]) or absolute frequency. RRP = recurrent respiratory papillomatosis.

*Two-sample t test;

**Pearson's chi-squared test

***Fisher's exact test.

genotypes: HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 87, 89, and 90. There is potential cross-reactivity of HPV 18 with HPV 45, HPV 26 with HPV 44, HPV 51 with HPV 82 and HPV 62 with HPV 81. HPV positivity is evaluated as minor, moderate or strong.

2.5 | Histopathology

An additional biopsy specimen of each laryngeal papilloma was sent to the Department of Pathology, where histopathological examination was performed. During examination, the diagnosis of squamous cell papilloma was confirmed and the level of dysplasia and Ki67 determined. Dysplasia was evaluated as none (0), mild (1), moderate (2) or severe (3).

2.6 | Statistical analysis

The primary analysis was performed using standard tools of exploratory data analysis. For the description of numerical variables, the mean and standard deviation (SD) or the median and interquartile range (IQR) are used. Categorical variables are presented with absolute and/or relative frequencies. Observed groups were compared in terms of demographics (eg age, sex), medical history (eg history of immunodeficiency, presence of diabetes mellitus) and the presence of risk factors (eg tobacco exposure, presence of herpetic viruses and HPV). A patient was labelled a stop-smoker if he or she quit smoking at least 2 years ago. The statistical analysis was performed using R software (version 3.6.0). The following statistical tests were used: two-sample t test, Mann-Whitney U test, Pearson's chi-squared test and Fisher's exact test with a 5% significance level.



FIGURE 1 EBV positivity (light purple curve in the left graph) of viral load 89,300 copies/ml in quantitative real-time PCR. Yellow curve in the left graph represents positive control and curves in the right graph represent internal controls for test validity

TABLE 2 Number of herpetic viruses present in biopsies

	RRP group	Control group
CMV	0	0
EBV	6	0
HSV-1	0	0
HSV-2	0	0
HHV-6	3	0
VZV	0	0

Abbreviations: CMV = cytomegalovirus; EBV = Epstein-Barr virus; HSV = herpes simplex virus; HHV = human herpesvirus; RRP = recurrent respiratory papillomatosis; VZV = varicella zoster virus.

TABLE 3 Human papilloma virus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) presence in biopsies

HPV 6/11 positivity	EBV presence, n		EBV concentration range for EBV + patients, IU/ml
	EBV+	EBV-	
Minor	2	2	1500-11000
Moderate	1	4	350
Strong	3	6	11000-1.8 x 10 ⁵

3 | RESULTS

A total of 36 patients were included in the study: 18 patients with laryngeal RRP and 18 patients with healthy laryngeal mucosa. We found no significant differences between the groups (Table 1). No side effect from biopsy was noted in either group. Conversely, all

patients reported improvement of their voice after surgery because healthy mucosa was obtained from the abundant part of the mucosal microflap after cyst removal.

3.1 | Virus presence

HPV was found in all of the biopsies from patients with RRP. Thirteen patients were positive for HPV 6, and 5 patients for HPV 11; no other genotype was found. HPV genotype and presence were not dependent on tobacco exposure (Fisher's exact test, $P = .567$ and 0.897 , respectively). HPV was found in none of the patients in the control group.

EBV was present in 33.3% of patients in the RRP group and in no patient in the control group ($P = .019$; Figure 1; Table 2). The number of EBV copies varied from 350 to 1.8×10^5 IU/ml. EBV presence was not dependent on tobacco exposure (Fisher's exact test, $P = .413$) or HPV genotype (Fisher's exact test, $P > .999$) or concentration (Table 3). EBV presence was strongly related to increased cell proliferation in all layers of the epithelium and to the number of surgeries performed in the last 2 years. Ki67 in all layers across the epithelium was 40.0 in EBV-positive compared to 31.0 in EBV negative patients ($P = .005$). The significantly higher Ki67 was observed in lower, middle and upper third of the laryngeal epithelium (Table 4).

HHV-6 was found in 16.7% (3/18) of biopsies in the RRP group, but in one case it was a false positivity due to the presence of non-infectious DNA integrated into the somatic genome (Figure 2). Two biopsies were positive for both EBV and HHV-6 (including the false-positive case). One biopsy was positive for HHV-6 only. No other herpetic virus was found in the biopsies of either group (Table 2).

	EBV+				EBV-				P value
No.	6				12				—
D/C score before surgery	7.5 (5.0-16.0)				12.0 (7.5-15.0)				0.636*
D/C score before/6 months after surgery	0.55 (0.29-0.60)				0.64 (0.25-0.70)				0.679*
Level of dysplasia	0	1	2	3	0	1	2	3	>0.999**
	3	2	1	0	6	5	1	0	
No. of surgeries last 2 years	2.5 (1.3-3.8)				1.0 (1.0-1.0)				0.039*
Ki67 lower third of the epithelium	90.0 (90.0-93.8)				80.0 (78.8-86.3)				0.010*
Ki67 middle third of the epithelium	20.0 (16.3-23.8)				7.5 (4.5-16.3)				0.023*
Ki67 upper third of the epithelium	7.5 (3.5-10.0)				2.0 (0.0-3.5)				0.032*
Ki67 total	40.0 (37.0-41.3)				31.0 (27.4-35.0)				0.005*

Note: Data are presented as absolute frequency or median (interquartile range). D/C = Derkay/Coltera; EBV = Epstein-Barr virus; HPV = human papillomavirus.

*Mann-Whitney U test.

**Fisher's exact test.

TABLE 4 AORRP characteristics according to EBV presence

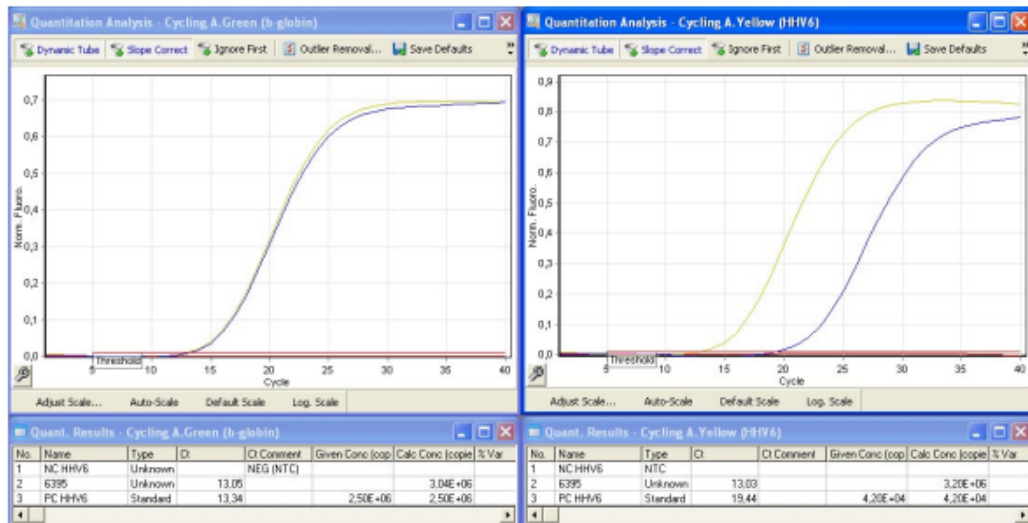


FIGURE 2 HHV-6 false positivity in quantitative real-time PCR due to the presence of non-infectious DNA integrated into the somatic genome. Yellow curve represents sample, blue curve represents positive control, and red (horizontal) curve represents negative control in both graphs. Beta-globin gene DNA (left graph) and HHV-6 DNA (right graph) ratio of approximately one to one (3.04×10^6 vs. 3.20×10^6) indicates the detection of HHV-6 DNA integrated into the somatic genome, not active HHV-6 infection

4 | DISCUSSION

In Europe, AORRP is more frequent than juvenile-onset RRP, with an incidence of 0.54 per 100,000 adults.¹⁴ In contrast to this relatively low incidence, HPV was present in the oral mucosa of 1.9% of healthy women in a large study by Lang Kuhs et al.⁹ In a study by Rautava et al., HPV was present in the oral mucosa of 15.1%–24.1% of women during a 6-year follow-up.¹⁰ Data about the asymptomatic presence of HPV in the respiratory tract of adults from large cohorts are missing. Previously, we found asymptomatic HPV in the larynx in 10% of adults, but no case in the current control group, indicating a possible cumulative presence in > 5% of healthy adults.⁸ Data from children indicate asymptomatic HPV in the respiratory tract of 10%–19.6%.^{6,7} Accordingly, AORRP seems to develop only in approximately 1 of 4,000 to 44,000 adults infected by HPV. Thus, HPV infection is necessary, but not sufficient, to cause AORRP, and other factors likely contribute to the pathogenesis of AORRP.

It seems that EBV may interact with HPV and contribute to the pathogenesis and progression of AORRP in up to one-third of patients. A synergistic effect between two or more viruses interacting at different stages of tumour development has been described.^{15,16} Although the EBV life cycle in epithelial cells remains poorly understood, its neoplastic potential is clear, as it is the main cause of nasopharyngeal carcinoma and is associated with an increased risk of oral squamous cell carcinoma.^{17–19} EBV is found in other head and neck carcinomas as well, but its exact role in pathogenesis has not yet been clarified.^{20,21} However, HPV and EBV co-infection has already

been shown to enhance the invasiveness of head and neck cancer cells and is associated with poor prognosis.^{20–22} EBV co-infection is also supposed a co-factor in the genesis and/or progression of cervical carcinoma.²³

HPV and EBV both infect and replicate in upper aerodigestive tract epithelia.^{24,25} Their life cycles share a relationship with the stratified epithelium, where the productive phase of the HPV life cycle and lytic reactivation of EBV are both induced upon differentiation of epithelial cells.¹⁷ Although the exact mechanisms of interaction still need to be revealed, results from the oral cavity have revealed several potential mechanisms that could be considered.¹⁷ Findings indicate that HPV infection has the potential to stabilise EBV in latently infected oral epithelial cells and increase EBV viral yield upon differentiation of the same cells by promoting EBV lytic reactivation.¹⁷ It could also lead to an increase in the likelihood of neoplasm and in the number of subsequent infection events. Induction of the lytic cycle in a fraction of cells can also increase the expression of viral and cellular cytokines and growth factors, such as vascular endothelial growth factor, which can enhance the proliferation of neighbouring cells.^{26–33} The enhanced proliferation corresponds to the results of our study, as EBV co-infection was strongly related to a significant increase in antigen Ki67 in all layers across the epithelium. Ki67 is a protein associated with cellular proliferation and ribosomal RNA transcription, and is a clinically important proliferation marker for grading multiple types of cancers, with well-established prognostic value.³⁴ The enhanced proliferation was also confirmed by a significantly higher number of previous papilloma

surgeries in EBV-positive patients with AORRP. We found no significant difference in the extent of disease. However, the authors consider it a marginal parameter that can be misleading, as it is very dependent on patient compliance. Less compliant patients usually have severe findings regardless of risk factors, as more time is given for the papillomas to grow and spread. Interestingly, EBV presence did not relate to dysplastic papilloma changes. Further research is required to elucidate the specific interactions between EBV and HPV and their role in pathogenesis.

According to the current results, CMV, HSV and VZV do not seem to contribute to the onset or course of AORRP. The effect of HHV-6 remains unclear, but the virus is very common in adults, and no sample was positive solely for HHV-6 when the false-positive result was excluded.

There are several issues that could potentially influence our results and need to be discussed. First, some authors consider EBV DNA detection using PCR to be a less suitable method with higher risk of false positivity because EBV could reside in B-lymphocytes that infiltrate tumour sites.²¹ However, this could be the case only for malignant tumours, in which cell invasion occurs through the basement membrane. AORRP is strictly a pathology of the epithelium, where only antigen-presenting cells are found, and their number is reduced by HPV infection.³⁵ If false positivity were the case, the number of EBV-positive samples would have to be much higher in both groups considering that latent EBV positivity is estimated in more than 90% of the world's population.³⁶

Second, the results should not be influenced by tobacco exposure, as tobacco exposure was not often present in the study group and neither HPV presence nor EBV presence was dependent on it.

Third, in contrast to the results of our previous study, HSV-2 co-infection does not seem to be a co-factor for AORRP, as it was present in none of the biopsies. To elucidate this issue, all papilloma biopsies sent for histopathological examination were subsequently evaluated by a single pathologist for the presence of HSV using immunohistochemistry with the same methodology as in our previous study.⁸ Biopsies of healthy mucosa could not be immunohistochemically evaluated because only one biopsy was obtained in each patient in the control group, which was used for PCR detection. The pathologist was blinded to the PCR results. Nine samples were slightly positive for HSV in both the nucleus and cytoplasm. False immunohistochemical HSV positivity was caused by the presence of an artificial tissue alteration (artefacts) considering that every positivity was slight and diffuse (nuclear and cytoplasmic). Artefacts could be caused by many different factors. According to the producer of HSV antibody, false-positive results may be seen because of non-immunological binding of proteins or substrate reaction products, or they may be caused by pseudoperoxidase activity, endogenous peroxidase activity, or endogenous biotin. In addition, the producer did not offer a positive control, and antibody dilution was the lowest recommended.

The main limit of our study is the sample size, which allows herpetic virus presence to be addressed as the primary aim of our study,

as well as essential subgroup characteristics, but it is too small to compare all characteristics of subgroups of patients with AORRP. Additional studies with larger cohorts are necessary.

5 | CONCLUSIONS

Unlike other herpetic viruses, Epstein-Barr virus seems to interact with human papillomavirus, enhancing cell proliferation and contributing to the pathogenesis and progression of adult-onset recurrent respiratory papillomatosis. Further research is required to elucidate specific interactions and their role in the pathogenesis of adult-onset recurrent respiratory papillomatosis.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the Ministry of Health, Czech Republic—conceptual development of research organisation (RVO FNOs/2019). We would like to thank assoc. prof. Karol Zelenik, MD, PhD; Mrs Lucia Staniková, MD, PhD; Mgr. Jakub Mrázek, and Mgr. Jana Vaculová, PhD for their contribution.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTION

All those named above are significant contributors to either design, data collection and analysis or interpretation of results. All contributed to the final manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

ORCID

Martin Formánek  <https://orcid.org/0000-0002-5759-2073>

REFERENCES

1. Derkay CS. Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;121:1386-1391.
2. Go C, Schwartz MR, Donovan DT. Molecular transformation of recurrent respiratory papillomatosis: viral typing and p53 overexpression. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003;112:298-302.
3. Derkay CS, Wiatrak B. Recurrent respiratory papillomatosis: a review. *Laryngoscope.* 2008;118:1236-1247.
4. Cogliano V, Baan R, Straif K, et al. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol.* 2005;6:204.
5. Rabah R, Lancaster WD, Thomas R, Gregoire L. Human papillomavirus-11-associated recurrent respiratory papillomatosis is more aggressive than human papillomavirus-6-associated disease. *Pediatr Dev Pathol.* 2001;4:68-72.
6. Szydłowski J, Jonczyk-Potoczna K, Pucher B, et al. Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) in upper respiratory tract mucosa in a group of pre-school children. *Ann Agric Environ Med.* 2014;21:822-824.

7. Rintala MA, Grénman SE, Järvenkylä ME, Syrjänen KJ, Syrjänen SM. High-risk types of Human Papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: experience from the Finnish HPV family study. *Clin Infect Dis*. 2005;41:1728-1733.
8. Formánek M, Jančatová D, Komínek P, Matoušek P, Zeleník K. Laryngopharyngeal reflux and herpes simplex virus type 2 are possible risk factors for adult-onset recurrent respiratory papillomatosis (prospective case-control study). *Clin Otolaryngol*. 2017;42:597-601.
9. Lang Kuhs KA, Gonzalez P, Struijk L, et al. Costa Rica vaccine trial group. Prevalence of and risk factors for oral human papillomavirus among young women in Costa Rica. *J Infect Dis*. 2013;208:1643-1652.
10. Rautava J, Willberg J, Louvanto K, et al. Prevalence, genotype distribution and persistence of human papillomavirus in oral mucosa of women: a six-year follow-up study. *PLoS One*. 2012;7:e42171.
11. Talliercio S, Cespedes M, Born H, et al. Adult-onset recurrent respiratory papillomatosis: a review of disease pathogenesis and implications for patient counseling. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015;141:78-83.
12. Ruiz R, Achlatis S, Verma A, et al. Risk factors for adult-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*. 2014;124:2338-2344.
13. Derkay CS, Malis DJ, Zalzal G, Wiatrak BJ, Kashima HK, Coltrera MD. A staging system for assessing severity of disease and response to therapy in recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*. 1998;108:935-937.
14. Omland T, Akre H, Vårdal M, Brøndbo K. Epidemiological aspects of recurrent respiratory papillomatosis: a population-based study. *Laryngoscope*. 2012;122:1595-1599.
15. Silver MI, Paul P, Sowjanya P, et al. Shedding of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus from the genital tract of women in a periurban community in Andhra Pradesh, India. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2435-2439.
16. Khenchouche A, Sadouki N, Boudriche A, et al. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus co-infection in cervical carcinoma in Algerian women. *Viol J*. 2013;10:340.
17. Maklelski KR, Lee D, Lorenz LD, et al. Human papillomavirus promotes Epstein-Barr virus maintenance and lytic reactivation in immortalized oral keratinocytes. *Virology*. 2016;495:52-62.
18. Shanmugaratnam K, Sobin LH. *Histology Typing of Tumours of the Upper Respiratory Tract and Ear*. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1991.
19. She Y, Nong X, Zhang M, Wang M. Epstein-Barr virus infection and oral squamous cell carcinoma risk: A meta-analysis. *PLoS One*. 2019;14:e0217659.
20. Jiang R, Ekshyyan O, Moore-Medlin T, et al. Association between human papilloma virus/Epstein-Barr virus coinfection and oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2015;44:28-36.
21. Turunen A, Rautava J, Grénman R, Syrjänen K, Syrjänen S. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNAs (EBERs) associated with poor prognosis of head and neck carcinomas. *Oncotarget*. 2017;8:27328-27338.
22. Drop B, Strycharz-Dudziak M, Kliszczewska E, Polz-Dacewicz M. Coinfection with Epstein-Barr Virus (EBV), Human Papilloma Virus (HPV) and Polyoma BK Virus (BKPv) in laryngeal, oropharyngeal and oral cavity cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18:E2752.
23. de Lima MAP, Neto PJN, Lima LPM, et al. Association between Epstein-Barr virus (EBV) and cervical carcinoma: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2018;148(2):317-328.
24. Herrero R. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003:47-51.
25. Vincent-Bugnas S, Vitale S, Mouline CC, et al. EBV infection is common in gingival epithelial cells of the periodontium and worsens during chronic periodontitis. *PLoS One*. 2013;8:e80336.
26. Hong GK, Kumar P, Wang L, et al. Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J Virol*. 2005;79(22):13984-13992.
27. Hsu MSY, Wu SS, Chang IJ, et al. Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta enhances chemotactic activity through induction of interleukin-8 in nasopharyngeal carcinoma cells. *J Virol*. 2008;82:3679-3688.
28. Ma SD, Hegde S, Young KH, et al. A new model of Epstein-Barr virus infection reveals an important role for early lytic viral protein expression in the development of lymphomas. *J Virol*. 2011;85:165-177.
29. Jones RJ, Seaman WT, Feng WH, et al. Roles of lytic viral infection and IL-6 in early versus late passage lymphoblastoid cell lines and EBV-associated lymphoproliferative disease. *Int J Cancer*. 2007;121:1274-1281.
30. Mahot S, Sergeant A, Drouet E, Gruffat H. A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta: induction of transcription of the hIL-10 gene. *J Gen Virol*. 2003;84:965-974.
31. Miyazaki I, Cheung RK, Dosch HM. Viral interleukin 10 is critical for the induction of B cell growth transformation by Epstein-Barr virus. *J Exp Med*. 1993;178:439-447.
32. Stewart JP, Behm FG, Arrand JR, Rooney CM. Differential expression of viral and human interleukin-10 (IL-10) by primary B cell tumors and B cell lines. *Virology*. 1994;200:724-732.
33. Swaminathan S, Hesselton R, Sullivan J, Kieff E. Epstein-Barr virus recombinants with specifically mutated BCRF1 genes. *J Virol*. 1993;67:7406-7413.
34. Sun X, Kaufman PD. KI-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018;127:175-186.
35. Leong CM, Doorbar J, Nindl I, Yoon HS, Hibma MH. Loss of epidermal Langerhans cells occurs in human papillomavirus alpha, gamma, and mu but not beta genus infections. *J Invest Dermatol*. 2010;130:472-480.
36. Tzellos S, Farrell PJ. Epstein-Barr virus sequence variation-biology and disease. *Pathogens*. 2012;1:156-174.

How to cite this article: Formánek M, Formánková D, Humík P, Vrtková A, Komínek P. Epstein-Barr virus may contribute to the pathogenesis of adult-onset recurrent respiratory papillomatosis: A preliminary study. *Clin Otolaryngol*. 2021;46:373-379. <https://doi.org/10.1111/coa.13681>

Příloha 3: FORMANEK, Martin*(corresponding author)*, Pavel KOMINEK, Debora JANCATOVA, Lucia STANIKOVA, Radoslava TOMANOVA, Jana VACULOVA, Milan URIK, Ivo SLAPAK a Karol ZELENIK. Laryngopharyngeal Reflux Is a Potential Risk Factor for Juvenile-Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis. Biomed Research International [online]. 2019, 2019, 1463896. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2019/1463896. (IF 2019 = 2,276; Q3)

Hindawi
BioMed Research International
Volume 2019, Article ID 1463896, 5 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/1463896>

Research Article

Laryngopharyngeal Reflux Is a Potential Risk Factor for Juvenile-Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis

Martin Formánek ¹, Pavel Komínek ¹, Debora Jančatová,¹ Lucia Staníková ¹, Radoslava Tomanová,² Jana Vaculová,² Milan Urik,³ Ivo Šlapák,³ and Karol Zelenik ¹

¹Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, University Hospital Ostrava, 17. Listopadu 1790, 70852 Ostrava, Czech Republic

²Department of Pathology, University Hospital Ostrava, 17. Listopadu 1790, 70852 Ostrava, Czech Republic

³Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Martin Formánek; martin.formanek@fno.cz

Received 18 July 2018; Revised 17 January 2019; Accepted 30 January 2019; Published 10 February 2019

Academic Editor: Marcelo A. Soares

Copyright © 2019 Martin Formánek et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction. Human papillomavirus (HPV) causes juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis (JORRP). Although HPV is common in children, the prevalence of JORRP is low. It is likely that other factors contribute to the pathogenesis of JORRP, during either activation or reactivation of a latent HPV infection. There is evidence that laryngopharyngeal reflux (LPR) might be such a risk factor for adult-onset recurrent respiratory papillomatosis. This study investigated if LPR might also be a risk factor for JORRP. **Materials and Methods.** Children with JORRP of the larynx that required microlaryngoscopy at a tertiary referral hospital were included in this prospective case-series study from November 2015 to November 2017. Using immunohistochemistry, HPV infection and pepsin associated with LPR were diagnosed from laryngeal biopsies. **Results.** Eleven children (aged 4-14 years) were analyzed. No patient had a history of immunodeficiency or tobacco smoke exposure. All patients underwent at least three previous surgeries due to JORRP and had been vaccinated against HPV in the past. Five children were treated using antiviral and immunomodulators. The only known maternal risk factor was that three mothers were primiparous. All 11 samples were infected with HPV (type 6 or 11). Pathologic LPR was diagnosed in 5/11 children (45.5%). **Conclusion.** LPR may be a risk factor for JORRP, contributing to its development by activating or reactivating a latent HPV infection. Results are in accordance with those from our previous study in adults.

1. Introduction

Juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis (JORRP) is a chronic viral disease affecting children. It is characterized by the growth of squamous cell tumors in the mucosa of the aerodigestive tract, with a predilection for the larynx. JORRP is the most common benign neoplasm of the larynx among children and the second most frequent cause of childhood hoarseness. Its incidence is 0.17-1.34 and prevalence 1.69-3.88 per 100,000 children. These values are higher in Africa than in Europe, North America, or Australia [1-6] and no difference in prevalence was found between the sexes [7]. In addition to hoarseness, the most common symptoms are stridor and respiratory distress [8]. JORRP is potentially very

aggressive and tends to recur. Although it is benign, it has an unpredictable clinical course, can spread into the respiratory tract, and can undergo malignant conversion [9, 10].

JORRP is caused by human papillomavirus (HPV) infection. It is a sexually transmitted disease, and children are mostly infected from HPV-positive mothers during vaginal delivery [11]. The risk of transmission is elevated among young primiparous mothers with condylomas [12]. Despite the low incidence of JORRP, the presence of asymptomatic HPV is relatively common in the respiratory tracts of children [13, 14]. Therefore, other factors have to contribute to the pathogenesis of JORRP, during either the activation or reactivation of HPV. It is unclear how HPV infection progresses to JORRP. The roles of local laryngeal irritants (i.e.,

tobacco, reflux, and secondhand smoke) in the acquisition, progression, and aggressiveness of disease are controversial. Some data question the dogma that active and passive smoking plays a role in recidivistic disease [15–17]. Several authors have also questioned the role of laryngopharyngeal reflux (LPR), mainly because of the lack of well-designed studies and less than ideal diagnostic methods of LPR, which were mostly limited to questionnaires or indirect signs of reflux, in existing studies [16, 18, 19].

In our recent study in adults, LPR was significantly more frequent in patients with adult-onset recurrent respiratory papillomatosis (AORRP) than control patients with healthy laryngeal mucosa, indicating LPR might be a risk factor for AORRP [15]. This study aimed to investigate if LPR might also be risk factor for JORRP using the same diagnostic scheme.

2. Materials and Methods

This prospective case-series study was approved by the Ethics Committee under identifier: 315/2014. It was performed in accordance with the Declaration of Helsinki, with good clinical practice, and it followed the applicable regulatory requirements. The study was registered at ClinicalTrials.gov under the identifier: NCT02592902. Written informed consent was obtained from the parents before initiating any procedure. The study was conducted from November 2015 to November 2017 at a tertiary referral hospital.

Children who had been diagnosed with JORRP of the larynx were included in the study if they had histologically confirmed, recurrent (at least two times during the previous two years) squamous cell papillomas in the laryngeal mucosa. Exclusion criteria were patients with contraindications for general anesthesia; patients with laryngeal papillomas undergoing microlaryngoscopy for the first time; and patients whose parents did not consent to participation in the study. Altogether there were 14 eligible patients. Two patients did not meet the inclusion criteria and one patient was excluded because his/her parents did not consent to participation in the study.

Biopsy specimens of laryngeal papillomas were obtained during microlaryngoscopy procedures. Paraffin-embedded sections (2–3 µm thick) were prepared from the biopsy samples (Benchmark XT, Roche, Ventana Medical Systems, Switzerland) and analyzed at the Department of Pathology by a single pathologist. In preparation for immunohistochemistry, samples were treated with hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase (Roche) and with Cell Conditioning 1 buffer (Roche) for antigen revitalization. Papillomavirus Mouse Monoclonal Antibody (types 6, 11, and 18) (NCL-HPV-4C4, Leica Biosystems, Germany, concentration 1:5) was used as the primary antibody to detect HPV. Anti-pepsin antibody (NB100-66518, Novus Biologicals, USA, concentration 1:100) was used as the primary antibody to detect pepsin. Samples were incubated with primary antibody for 32 min. The results were visualized with the iView DAB Detection Kit (Roche). The presence of any antibody positivity in the cytoplasm of the cells was considered pathological and the sample was identified as pepsin positive.

The following variables were examined: the child's age, tobacco smoke exposure, history of immunodeficiency, HPV vaccination and previous treatment, the number of previous JORRP surgeries, whether the mother was primiparous, the age of the mother at delivery, the mother's history of condylomata, the results of Papanicolaou test in the period around childbirth, the presence and type of HPV, and the presence of pepsin in the biopsy. Statistical analysis was performed using Microsoft Excel.

3. Results

This study included eleven children with JORRP, six girls and five boys. The average age was 8 years. No patient had a history of immunodeficiency or tobacco smoke exposure. All patients had voice problems and coughs, while no patient suffered from heartburn or dysphagia. All patients underwent at least three previous surgeries due to JORRP. All patients had been vaccinated against HPV (Silgard®) in the past. Five children were treated by antivirotics and immunomodulators. The only known maternal risk factor was that three mothers were primiparous (Table 1). Histological findings confirmed squamous cell papillomas in all samples. There was no malignancy. Immunohistochemical analyses showed that HPV had infected all 11 samples; HPV type 6 was confirmed in nine samples and HPV type 11 in two samples. Pepsin was detected in five samples, indicating the presence of relevant pathologic LPR (Table 1).

4. Discussion

JORRP is a chronic viral disease caused by HPV. Currently, over 120 types of HPV have been identified. They are grouped according to pathophysiology and tissue preference [8, 20]. JORRP is mostly caused by HPV types 6 and 11, which are the etiological agents of over 90% of genital warts [8, 21]. In addition, specific viral subtypes may be correlated with disease severity and the clinical course; for example, an HPV type 11 infection is associated with a poor course and a poor prognosis [22]. In the present study, HPV (type 6 and 11) was confirmed in all biopsy specimens in children with JORRP, despite the fact that all children were vaccinated against HPV with three doses of Silgard® vaccine (0, 2, and 4 month intervals) before the beginning of our study. This finding is consistent with the vaccine not being therapeutic, as all children were vaccinated after the onset of JORRP.

Although the risk of HPV transmission is higher for children with young, primiparous mothers with condylomas, no mother in our case series had a history of condylomata and three mothers were primiparous. In addition, no mother reported a pathological Papanicolaou test in the period around childbirth. However, we did not have the exact results; therefore we had to rely only on anamnestic data that may not be accurate. In contrast to the relatively low incidence of JORRP, the reported prevalence of HPV is relatively high. Szydłowski et al. [13] reported that HPV was present in the respiratory tract in 19.6% of healthy preschool children, while Rintala et al. [14] reported that 10% of healthy children had HPV in the respiratory tract at a 3-year follow up after

TABLE 1: Characteristics of the study participants.

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Sex	F	M	F	M	F	F	F	M	M	F	M
Age (years)	4	6	8	11	8	6	4	8	14	9	10
No. of previous JORRP surgeries	5	7	13	11	5	3	7	11	4	4	5
Primiparous mother	yes	no	no	no	no	no	yes	yes	no	no	no
Age of mother at delivery (years)	22	27	27	24	30	29	23	22	28	25	26
Mother with history of condylomata	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Inosine pranobex	no	no	no	yes	no	yes	no	yes	yes	yes	no
HPV type	11	6	6	6	6	6	6	6	6	11	6
Pepsin	pos.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.

F = female, M = male, JORRP = juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis, pos. = positive, and neg. = negative.

birth. Durzynska et al. found that HPV was present in the oropharynx in 1.08% of asymptomatic children aged 10-18 years. The most frequent HPV genotypes were types 6 and 11 [23]. Those findings suggested that additional risk factors might contribute to the development of JORRP by activating or reactivating a latent HPV infection.

It was previously shown that LPR could cause or facilitate many pathologies in children, including acute or chronic otitis media and laryngitis [24, 25]. Many studies demonstrated that contact between refluxed material and the mucosa caused local inflammation and edema. The presence of pepsin in the refluxate is considered a primary pathogenic factor, which causes proteolysis and cell damage. LPR could potentially induce JORRP by a very similar mechanism. Evidence has shown that gastroesophageal reflux occurs in approximately two-thirds of infants at 4 months of age, but decreases as the child matures [26-28]. All children in our study were 4 years and older; therefore, LPR should not be present in these patients. The diagnosis of LPR is challenging. Questionnaires are not suitable and the symptoms of LPR are both heterogeneous and very common. The situation is even more complicated in case of JORRP. Voice problems are very often symptoms of LPR, but they are always present in JORRP. Moreover, JORRP can cause other symptoms related to reflux, like globus pharyngeus and cough. Symptoms of JORRP were the dominant complaints in our study. As expected, no children suffered from heartburn as it is only pathognomonic for gastroesophageal reflux.

Therefore, it is very important to choose the proper diagnostic method for evaluating whether LPR is a relevant factor. Measuring pepsin in fluids or tissues appears to be the most suitable method for evaluating a possible relationship between a pathology and LPR [24, 29]. The advantage of pepsin detection over esophageal impedance is that pepsin can be detected in tissues and fluids, even in the absence of a reflux event within the past several days [24]. Moreover, the presence of pepsin inside the mucosal cell cytoplasm indicates that LPR is a relevant factor, because it is typically absent in the cytoplasm of healthy laryngeal mucosa. Thus, this is one of the benefits of this test compared with the more

often used lavage of the laryngeal/tracheal mucosa, in which pepsin is assayed in the aspirate and only intraluminal pepsin is tested. An intraluminal presence does not necessarily mean that the pepsin overcame the cell's protecting mechanism and LPR is a relevant factor. In our case, intraluminal pepsin could also provide false positive results, considering the nonphysiological conditions during intubation and general anesthesia, in which there is significant risk of aspiration [30]. Therefore, the pepsin measurement used in our study provided the most accurate data. The disadvantage is that the technique is invasive. However, that was not an issue as the papillomas had to be removed. In our study, pepsin was detected in the cell cytoplasm in 5 of 11 children with JORRP, regardless of the HPV type. Accordingly, these patients suffered from relevant pathologic LPR affecting the larynx. This finding indicated that LPR could be a risk factor for JORRP in these patients and may affect its course.

In accordance with previously reported data, passive smoking was not a factor in our study. No child was exposed to tobacco in his or her family. In addition, no child had a history of immunodeficiency. Thus, these general risk factors did not affect the results. Our observations suggested that the LPR could be a potential risk factor for JORRP, contributing to its development by activating or reactivating a latent HPV infection. To our knowledge, this is the first report to demonstrate a possible relationship.

A limit of our study is the small sample size. However, the aim was to evaluate another risk factor of JORRP and to encourage the initiation of other studies. Another limitation was the absence of a control group, which would be clearly beneficial. However, any biopsy of children's healthy laryngeal mucosa or any LPR diagnostic procedure (e.g., esophageal impedance) in healthy children would be unethical. Children with vocal cysts could be included in the control group. Healthy mucosa would be obtained from reduction of the mucosa flap after cyst removal, as was done previously in a study of adults [15]. However, this pathology is very rare in children and such a small biopsy specimen is not always suitable for analysis. We believe children with other glottic or subglottic pathologies would not be suitable for inclusion in

the control group because of a risk of bias due to LPR being a potential etiopathogenetic factor of such pathologies. Thus, healthy mucosa distant from the pathology would have to be removed and this would not be approved. However, no pepsin should be present in the cell cytoplasm of healthy laryngeal mucosa. Therefore, any pepsin positivity shows relevant LPR affecting the examined tissue. This was also confirmed in our previous study where no adults in the control group with healthy laryngeal mucosa were pepsin positive [15]. Case-control studies are needed to confirm these preliminary results in children. It remains unclear how and whether LPR should be treated in cases of JORRP. It is unknown if treatment of LPR alters the course of the disease, as it could also play a role only in its onset. Further studies addressing this issue are needed.

5. Conclusions

LPR may be a risk factor for JORRP by activating or reactivating a latent HPV infection. The findings here are in accordance with results of our previous study in adults.

Data Availability

All anonymized clinical and histopathological data that have been analyzed are in Table 1. The samples of the patients which were analyzed are stored in Department of Pathology, University Hospital Ostrava (address: 17 Listopadu 1790, 708 52 Ostrava, Czech Republic).

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This research was supported by the Ministry of Health, Czech Republic-Conceptual Development of Research Organization (FNOs/2014).

References

- [1] T. Omland, H. Akre, M. Vårdal, and K. Brøndbo, "Epidemiological aspects of recurrent respiratory papillomatosis: a population-based study," *The Laryngoscope*, vol. 122, no. 7, pp. 1595–1599, 2012.
- [2] L. R. Armstrong, E. J. D. Preston, M. Reichert et al., "Incidence and prevalence of recurrent respiratory papillomatosis among children in Atlanta and Seattle," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 31, no. 1, pp. 107–109, 2000.
- [3] P. Campisi, M. Hawkes, and K. Simpson, "The epidemiology of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis derived from a population level national database," *Laryngoscope*, vol. 120, pp. 1233–1245, 2010.
- [4] R. Y. Seedat, "The incidence and prevalence of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis in the Free State province of South Africa and Lesotho," *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, vol. 78, no. 12, pp. 2113–2115, 2014.
- [5] M. Marsico, V. Mehta, B. Chastek, K.-L. Liaw, and C. Derkay, "Estimating the incidence and prevalence of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis in publicly and privately insured claims databases in the United States," *Sexually Transmitted Diseases*, vol. 41, no. 5, pp. 300–305, 2004.
- [6] D. Novakovic, A. T. L. Cheng, K. Baguley et al., "Juvenile recurrent respiratory papillomatosis: 10-year audit and Australian prevalence estimates," *The Laryngoscope*, vol. 126, no. 12, pp. 2827–2832, 2016.
- [7] L. R. Armstrong, C. S. Derkay, and W. C. Reeves, "Initial results from the national registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. RRP task force," *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, vol. 125, no. 7, pp. 743–748, 1999.
- [8] C. S. Derkay and B. Wiatrak, "Recurrent respiratory papillomatosis: a review," *The Laryngoscope*, vol. 118, no. 7, pp. 1236–1247, 2008.
- [9] C. S. Derkay, "Task force on recurrent respiratory papillomas: a preliminary report," *Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, vol. 121, no. 12, pp. 1386–1391, 1995.
- [10] C. Go, M. R. Schwartz, and D. T. Donovan, "Molecular transformation of recurrent respiratory papillomatosis: viral typing and p53 overexpression," *Annals of Otolaryngology & Laryngology*, vol. 112, no. 4, pp. 298–302, 2003.
- [11] C. J. N. Lacey, C. M. Lowndes, and K. V. Shah, "Chapter 4: burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease," *Vaccine*, vol. 24, pp. 35–41, 2006.
- [12] K. V. Shah, W. F. Stern, F. K. Shah, D. Bishai, and H. K. Kashima, "Risk factors for juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis," *The Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 17, no. 5, pp. 372–376, 1998.
- [13] J. Szydłowski, K. Jończyk-Potoczna, B. Pucher et al., "Prevalence of human papillomavirus (HPV) in upper respiratory tract mucosa in a group of pre-school children," *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, vol. 21, no. 4, pp. 822–824, 2014.
- [14] M. A. M. Rintala, S. E. Grénman, M. E. Järvenkylä, K. J. Syrjänen, and S. M. Syrjänen, "High-risk types of human papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: experience from the Finnish HPV family study," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 41, no. 12, pp. 1728–1733, 2005.
- [15] M. Formánek, D. Jančatová, P. Komínek, P. Matoušek, and K. Zeleník, "Laryngopharyngeal reflux and herpes simplex virus type 2 are possible risk factors for adult-onset recurrent respiratory papillomatosis (prospective case-control study)," *Clinical Otolaryngology*, vol. 42, no. 3, pp. 597–601, 2017.
- [16] S. Taliercio, M. Cespedes, H. Born et al., "Adult-onset recurrent respiratory papillomatosis: A review of disease pathogenesis and implications for patient counseling," *JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, vol. 141, no. 1, pp. 78–83, 2015.
- [17] R. Ruiz, S. Achlatis, A. Verma et al., "Risk factors for adult-onset recurrent respiratory papillomatosis," *The Laryngoscope*, vol. 124, no. 10, pp. 2338–2344, 2014.
- [18] M. McKenna and L. Brodsky, "Extraesophageal acid reflux and recurrent respiratory papilloma in children," *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, vol. 69, no. 5, pp. 597–605, 2005.
- [19] M. R. M. San Giorgi, H. M. Helder, R.-J. S. Lindeman, G. H. de Bock, and F. G. Dikkers, "The association between

- gastroesophageal reflux disease and recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review," *The Laryngoscope*, vol. 126, no. 10, pp. 2330–2339, 2016.
- [20] P. Draganov, S. Todorov, I. Todorov, T. Karchev, and Z. Kalvatchev, "Identification of HPV DNA in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis using SYBR® Green real-time PCR," *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, vol. 70, no. 3, pp. 469–473, 2006.
- [21] H. K. Kashima, F. Shah, A. Lyles et al., "A comparison of risk factors in juvenile-onset and adult-onset recurrent respiratory papillomatosis," *The Laryngoscope*, vol. 102, no. 1, pp. 9–13, 1992.
- [22] R. Rabah, W. D. Lancaster, R. Thomas, and L. Gregoire, "Human papillomavirus-11-associated recurrent respiratory papillomatosis is more aggressive than human papillomavirus-6-associated disease," *Pediatric and Developmental Pathology*, vol. 4, no. 1, pp. 68–72, 2001.
- [23] J. Durzyńska, J. Pacholska-Bogalska, M. Kaczmarek et al., "HPV genotypes in the oral cavity/oropharynx of children and adolescents: Cross-sectional survey in Poland," *European Journal of Pediatrics*, vol. 170, no. 6, pp. 757–761, 2011.
- [24] A. Jiang, M. Liang, Z. Su et al., "Immunohistochemical detection of pepsin in laryngeal mucosa for diagnosing laryngopharyngeal reflux," *The Laryngoscope*, vol. 121, no. 7, pp. 1426–1430, 2011.
- [25] M. Crapko, J. E. Kerschner, M. Syring, and N. Johnston, "Role of extra-esophageal reflux in chronic otitis media with effusion," *The Laryngoscope*, vol. 117, no. 8, pp. 1419–1423, 2007.
- [26] W. S. Gibson Jr. and W. Cochran, "Otolgia in infants and children - a manifestation of gastroesophageal reflux," *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, vol. 28, no. 2-3, pp. 213–218, 1994.
- [27] S. P. Nelson, E. H. Chen, G. M. Syniar, and K. K. Christoffel, "Prevalence of symptoms of gastroesophageal reflux during infancy. A pediatric practice-based survey. Pediatric practice research group," *JAMA Pediatrics*, vol. 151, no. 6, pp. 569–572, 1997.
- [28] J. Poelmans, J. Tack, and L. Feenstra, "Prospective study on the incidence of chronic ear complaints related to gastroesophageal reflux and on the outcome of antireflux therapy," *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, vol. 111, no. 10, pp. 933–938, 2002.
- [29] Martin Formánek, Pavel Komínek, Petr Matoušek, Radoslava Tomanova, Ondřej Urban, and Karol Zeleník, "Comparison of three methods used in the diagnosis of extraesophageal reflux in children with chronic otitis media with effusion," *Gastroenterology Research and Practice*, vol. 2015, Article ID 547959, 5 pages, 2015.
- [30] M. A. Warner, M. E. Warner, and J. G. Weber, "Clinical significance of pulmonary aspiration during the perioperative period," *Anesthesiology*, vol. 78, no. 1, pp. 56–62, 1993.

Příloha 4: FORMANEK, Martin*(corresponding author)*, Debora JANCATOVA, Pavel KOMINEK, Radoslava TOMANOVA a Karol ZELENIK. Comparison of Impedance and Pepsin Detection in the Laryngeal Mucosa to Determine Impedance Values that Indicate Pathological Laryngopharyngeal Reflux. *Clinical and Translational Gastroenterology* [online]. 2017, 8, e123. ISSN 2155-384X. Dostupné z: doi:10.1038/ctg.2017.49. (IF 2017 = 4,621; Q1)

Citation: *Clinical and Translational Gastroenterology* (2017) 8, e123; doi:10.1038/ctg.2017.49
Official journal of the American College of Gastroenterology
www.nature.com/ctg

Comparison of Impedance and Pepsin Detection in the Laryngeal Mucosa to Determine Impedance Values that Indicate Pathological Laryngopharyngeal Reflux

Martin Formánek, MD, PhD¹, Debora Jančátová, MD¹, Pavel Komínek, MD, PhD, MBA¹, Radoslava Tomanová, MD² and Karol Zelenik, MD, PhD¹

OBJECTIVE: Recently, a 24-h impedance was used to detect laryngopharyngeal reflux (LPR). However, not every case of LPR is pathological. Thus, pathological pharyngeal impedance values need to be clearly established to diagnose pathological LPR. The aim of our study was to establish pathological 24-h pharyngoesophageal impedance/pH values for the diagnosis of LPR.

METHODS: The study was conducted in a tertiary care setting. A total of 30 patients who were referred to microlaryngoscopy for a laryngeal pathology that might be caused by LPR were included in this prospective study. All patients were off proton-pump inhibitor therapy. The 24-h pharyngoesophageal impedance-pH monitoring was performed 1 day before surgery. A biopsy of laryngeal tissue was obtained during microlaryngoscopy and was analyzed by immunohistochemistry to detect pepsin. The patients were divided into two groups: pepsin negative and pepsin positive (which indicated pathological LPR). The results of 24-h multichannel intraluminal impedance-dual-channel pH monitoring were compared between the groups. The number of LPR episodes in the pepsin-positive group was analyzed to establish a cutoff value for pathological LPR.

RESULTS: There were 18 participants in the pepsin-negative group and 12 in the pepsin-positive group. The median total pharyngeal refluxes detected were two (0–5) in the pepsin-negative group and 14 (6–39) in the pepsin-positive group ($P < 0.001$), although the groups were otherwise homogeneous. There was a statistically significant difference in the number of all types of refluxes between groups. Six or more pharyngeal refluxes were the cutoff for the presence of pepsin in the laryngeal mucosa and, thereby, for the diagnosis of relevant/pathological LPR.

CONCLUSION: Six or more pharyngeal reflux episodes registered during the 24-h impedance/pH monitoring seem to be the cutoff for diagnosing pathological LPR. Therefore, it is possible to suggest establishing this value as the pathological impedance value indicating pathological LPR. These results must be interpreted with caution due to the small sample size.

Clinical and Translational Gastroenterology (2017) 8, e123; doi:10.1038/ctg.2017.49; published online 26 October 2017

Subject Category: Esophagus

INTRODUCTION

Laryngopharyngeal reflux (LPR) is defined as the reflux of (duodeno)gastric contents above the upper esophageal sphincter. The protecting mechanisms in nonesophageal mucosa are insufficient; therefore, LPR can cause or facilitate many pathologies of the aerodigestive tract, such as chronic laryngitis and pharyngitis, acute or chronic otitis media, and rhinosinusitis.^{1–4} Many novel methods have recently been available for diagnosing LPR. However, an ideal method does not exist. Currently, 24-h multichannel intraluminal esophageal impedance or pH monitoring is considered to be the gold standard for diagnosing gastroesophageal reflux disease (GERD).⁵ Combined pH and impedance monitoring can detect all types of reflux episodes (acidic, weakly acidic, and alkaline) within the esophageal lumen and their composition (liquid, gas, or mixed). Moreover, 24-h multichannel intraluminal esophageal impedance or pH monitoring seems to be very promising for diagnosing pathological LPR.⁶

However, detecting pathological LPR can be difficult. Some episodes of LPR are present in healthy individuals; therefore, not every episode is pathological (causing extraesophageal reflux disease). There may be several episodes of reflux above the upper esophageal sphincter that do not harm the mucosa. Oelschlager *et al.* reported a median number of five pharyngeal reflux episodes in 10 asymptomatic controls during 24-h monitoring.⁷ On the other hand, Hoppo *et al.* more recently reported only one pharyngeal reflux event in 34 healthy subjects during 24-h monitoring.⁸ Zerbib *et al.* detected during 24-h monitoring a total of 32 pharyngeal reflux events in 12 healthy subjects with one subject having 12 pharyngeal reflux events. However, the median number of pharyngeal reflux events was zero.⁹

These discrepancies clearly demonstrate how the analysis of pharyngeal impedance tracings and diagnostics of LPR are challenging and require accurate and reproducible diagnostic criteria. The most accurate diagnostic method of relevant LPR remains to be pepsin detection in tissues.² However, this

¹Department of Otorhinolaryngology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic and ²Department of Pathology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

Correspondence: Martin Formánek, MD, PhD, Fakultní Nemocnice Ostrava, Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, University Hospital Ostrava, 17. listopadu 1790, Ostrava 708 52, Czech Republic. E-mail: martin.formanek@fn.ostrava.cz

Received 16 August 2017; accepted 13 September 2017

requires a biopsy of the larynx, usually under general anesthesia that carries a risk of tissue scarring. Thus, it is not suitable for routine diagnostics, unlike pharyngeal impedance.

There is also a new diagnostic method of LPR—salivary pepsin test, which is questioned for a routine diagnostic.^{10,11} Pepsin detection in saliva is much less invasive. On the contrary, there are several disadvantages. Pepsin positivity is measured in the oral cavity; therefore, a lot of pharyngeal refluxes, which reach only the hypopharynx, larynx, or oropharynx could be missed. Saliva samples must be obtained soon after a reflux event. Furthermore, even asymptomatic subjects have pepsin positivity in saliva and the cutoff for pathological LPR is missing. In the study of Yadlapati *et al.*, neither oropharyngeal pH testing nor salivary pepsin analysis were able to distinguish between healthy volunteers and subjects with a combination of laryngeal and reflux symptoms.¹¹

Accordingly, the best way to improve routine LPR diagnostics is to improve the accuracy of pharyngeal impedance for the detection of relevant pathological LPR. Therefore, the aim of our study was to use pepsin detection in laryngeal mucosa for the identification of relevant pathological LPR and compare these findings to the results from 24-h pharyngoesophageal 8-channel intraluminal impedance/2-channel pH monitoring performed in the same patient 1 day before surgery to establish pharyngeal impedance values for pathological LPR.

METHODS

This prospective study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Ostrava. It was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and good clinical practice, and it followed the applicable regulatory requirements. The study was registered at ClinicalTrials.gov under the identifier: NCT02592902. Written informed consent was obtained from the patients before initiating any procedure. The study was conducted between January 2015 and December 2016. All authors had access to the study data and had reviewed and approved the final manuscript.

Adult patients with a diagnosed laryngeal pathology, in which a reflux might be considered as an etiopathogenetic factor such as vocal cord granuloma, recurrent laryngeal papillomatosis, and vocal cord polyp, who were referred for microlaryngoscopy were included in the study. Voice problems, breathing problems, and the necessity of histological verification of the pathology were the main indications for surgical treatment. All patients were off proton-pump inhibitor therapy. The exclusion criteria were patients with contraindications for general anesthesia, patients who did not consent to be included in the study, patients with a history of thoracic or digestive surgery (except appendectomy), gastrointestinal disease, consuming 40 g/day alcohol, smoking 20 cigarettes/day, and patients treated with medications that alter intragastric acidity or esophageal motility.

24-h multichannel intraluminal impedance–dual-channel pH monitoring. The 24-h multichannel intraluminal impedance–dual-channel pH monitoring, using the Digitrapper pH-Z Testing System (Medtronic, Minneapolis, MN, USA), was performed 1 day before surgery. A VersaFlex LPR ZNID19

+8R impedance catheter (Medtronic) was used with pH sensors at 0 cm (proximal) and 19 cm (distal), and eight impedance rings were located—1, 2, 5, 7, 9, 18, 20, and 22 cm from the proximal pH sensor (Figure 1). Before recording, the catheter was calibrated using buffer solutions at pH values of 4.0 and 7.0. The proximal pH sensor was placed in the hypopharynx 2 cm above the upper esophageal sphincter. The right sensor position was always verified using a flexible laryngoscope. A Digitrapper Recorder (Medtronic) was used for data recording. Patients were instructed to use the device to record the time they spent on eating, drinking, and in a horizontal position. Tracings were analyzed (after a visual check) using AccuView Reflux Software (Medtronic). The number of acid (pH < 4), weakly acid (pH 4–7), and alkaline pharyngeal reflux episodes were obtained.

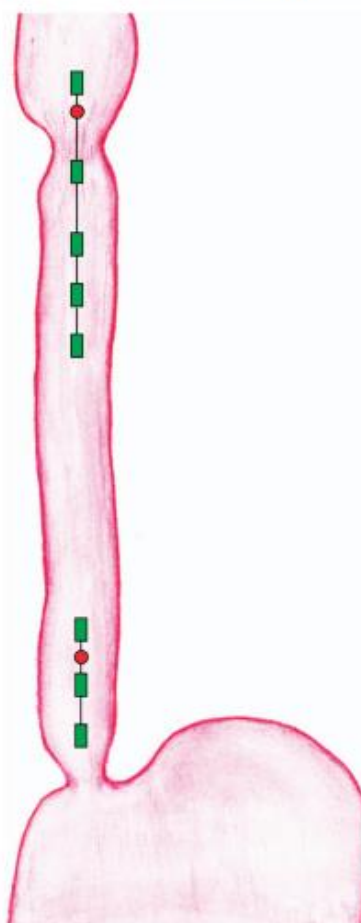


Figure 1 Scheme of the VersaFlex® LPR ZNID19+8R impedance catheter placement (green rectangle = impedance sensor, red circle = pH sensor).

Pepsin detection. Biopsy specimens of the laryngeal tissue were obtained during microlaryngoscopy procedures. Paraffin-embedded sections (2–3- μ m thick) were prepared from the biopsy samples (Ventana Medical Systems, AZ, USA) and analyzed at the Department of Pathology by a single pathologist. Immunohistochemical analysis was performed after endogenous peroxidase blocking with hydrogen peroxide (Ventana) and antigen revitalization in CC1 buffer (Ventana). A pepsin antibody (NB100-66518, Novus Biologicals, CO, USA, diluted at a ratio of 1:100) was used as the primary antibody to detect pepsin. The incubation period for the primary antibody was 32 min. The iView DAB Detection Kit (Roche, Switzerland) was used to visualize the antigens. The presence of any antibody positivity in the cytoplasm of the cells was considered to be pathological and the sample was evaluated as pepsin positive.

Statistical analysis. The patients were divided into two groups, pepsin positive and pepsin negative. The results of the 24-h multichannel intraluminal impedance–dual-channel pH monitoring were compared between the groups. The number of LPR episodes in the pepsin-positive group was analyzed to establish a pathological cutoff value for LPR. Descriptive statistics, such as the arithmetic mean, standard deviation, and absolute and relative frequency tables, were used for data processing. The Shapiro–Wilk test was used to test for normality. The two-sample *t*-test, Mann–Whitney test, and Pearson's χ^2 test were consequently used based on the normality results. Fisher's exact test was used when Pearson's χ^2 test could not be used.

The calculation of sensitivity, specificity, and negative and positive predictive values with likelihood ratios were used for evaluation of the reliability of pepsin detection. Kaplan–Meier survival estimate, CHAID (Chi-square Automatic Interaction Detector), and Youden's index were used as well. Receiver-operating curve was used for data visualization. The statistical tests were assessed using a significance level of 5%. The statistical analysis was performed using Stata 13 software (Stata Corp., College Station, TX, USA). Risk groups identification was performed using SPSS Answer Tree 3.1 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

RESULTS

The study was conducted between January 2015 and December 2016. A total of 30 adult patients were included in the prospective study. Sixteen patients had vocal cord granuloma, 8 patients suffered from recurrent laryngeal papillomatosis, and 6 patients had vocal cord polyp. The average age of the participants was 43.7 ± 15.66 years. There were more men (53.3%) than women (46.7%).

Groups. Participants were divided into two groups according to the pepsin negativity/positivity determined from the laryngeal biopsy. There were 18 participants in the pepsin-negative group and 12 in the pepsin-positive group. There were no differences between the groups in terms of age, bodyweight, BMI, sex, history of immunodeficiency, allergy, diabetes mellitus, or tobacco exposure (Tables 1 and 2). There were more women in the pepsin-negative

group (11/18; 61%) than in the pepsin-positive group (3/12; 25%), but this difference was not significant ($P=0.072$).

Comparison of 24-h pharyngoesophageal intraluminal impedance–pH monitoring results with pepsin detection–pharyngeal sensor. The median of all pharyngeal reflux episodes detected by intraluminal impedance–pH monitoring was two in the pepsin-negative group and 14 in the pepsin-positive group. The range of pharyngeal reflux episodes varied from 0 to 5 in the pepsin-negative group and from 6 to 39 in the pepsin-positive group ($P<0.001$) (Figure 2, Table 3). There was a significant difference in the number of all types of refluxes. Six or more pharyngeal reflux episodes were identified as the cutoff for the presence of pepsin in the laryngeal mucosa and, thereby, for the diagnosis of relevant/pathological LPR (Figures 3 and 4). The sensitivity for identifying pepsin (and diagnosing relevant/pathological LPR) using six or more pharyngeal refluxes as the cutoff was 100% (confidence interval (CI): 73.5–100%) and the specificity was 100% (CI: 81.4–100%). The negative and positive predictive values were 100%.

Comparison of 24-h pharyngoesophageal intraluminal impedance–pH monitoring results with pepsin detection–esophageal sensor. The median of all esophageal reflux episodes detected by intraluminal impedance–pH

Table 1 General characteristics of the study participants according to pepsin negativity/positivity

Pepsin	No.	Median	Mean	SD	Min	Max	<i>P</i> value
<i>Age</i>							
Neg.	18	41.0	44.3	16.09	20	72	0.8022 ^a
Pos.	12	39.5	42.8	15.64	19	74	
<i>Height</i>							
Neg.	18	169.0	170.9	12.38	152	195	0.0901 ^a
Pos.	12	178.0	178.1	8.43	164	192	
<i>Bodyweight</i>							
Neg.	18	81.0	82.7	19.95	57	114	0.2068 ^a
Pos.	12	94.0	91.4	15.00	60	112	
<i>BMI</i>							
Neg.	18	27.8	28.2	5.43	21.5	43.7	0.4981 ^b
Pos.	12	30.1	28.5	3.78	22.3	32.9	

BMI, body mass index; SD, standard deviation.

^aTwo-sample *t*-test.

^bMann–Whitney test.

Table 2 Medical history of the study participants according to pepsin negativity/positivity

	Pepsin negative		Pepsin positive		<i>P</i> value ^a
	Yes	No	Yes	No	
Allergy	2	16	3	9	0.364
Tobacco exposure	8	10	3	9	0.442
Immunodeficiency	0	18	0	18	—
Diabetes mellitus	1	17	1	11	1.000

^aFisher's exact test.

monitoring was 9 in the pepsin-negative group and 25 in the pepsin-positive group. The range of esophageal reflux episodes varied from 2 to 23 in the pepsin-negative group and from 8 to 58 in the pepsin-positive group ($P < 0.001$) (Table 4). There was a significant difference in the number of acid and alkaline refluxes. The esophageal acid exposure time and DeMeester Score were significantly higher in the pepsin-positive group (Table 4).

Sixteen or more esophageal reflux episodes were identified as the cutoff for the presence of pepsin in the laryngeal mucosa and, thereby, for the diagnosis of relevant/pathological LPR (Figure 5). The sensitivity for identifying pepsin using 16 or more esophageal refluxes as the cutoff was 83.3% (CI: 51.6–97.9%) and the specificity was 88.9% (CI: 65.3–98.6%). The negative and positive predictive values were 88.9% and 83.3%, respectively.

GERD was diagnosed if the number and type of the esophageal episode or DeMeester Score were pathological. There was one patient (5.6%) suffering from GERD in the pepsin-negative group and seven patients (58.3%) in the pepsin-positive group ($P = 0.001$, Pearson's χ^2).

DISCUSSION

The aim of our study was to establish pathological values from 24-h pharyngo-esophageal impedance/pH monitoring for the diagnosis of LPR. Pathological LPR was defined as the

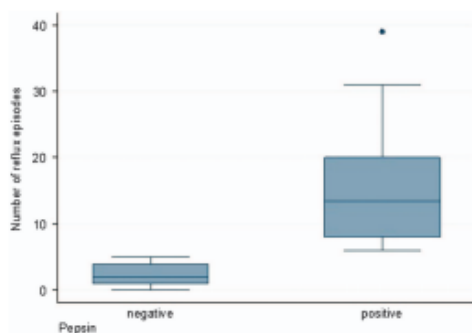


Figure 2 Number of all pharyngeal reflux episodes in patients in the pepsin-negative/positive groups.

presence of pepsin in the cytoplasm of the laryngeal mucosa cells.

The advantage of pepsin detection over pharyngeal or esophageal impedance is that pepsin can be detected in

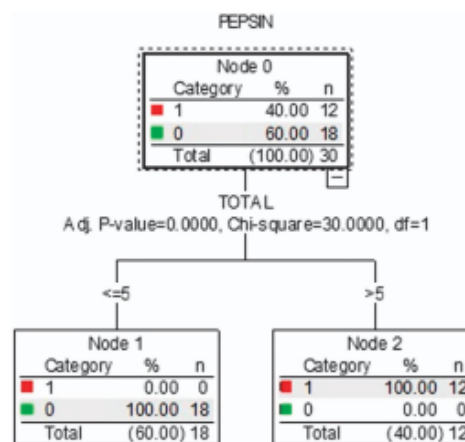


Figure 3 χ^2 automatic interaction detector (pepsin 0 = negative, pepsin 1 = positive) showing six or more pharyngeal reflux episodes as the cutoff for the presence of pepsin in the laryngeal mucosa.

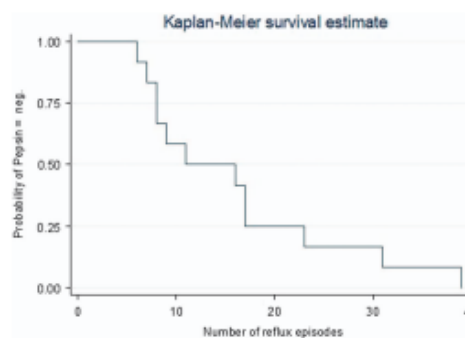


Figure 4 Kaplan-Meier survival estimate.

Table 3 Comparison of the type and number of pharyngeal refluxes in patients in the pepsin-negative/positive groups

Pharyngeal pH-metry results	Pepsin	Median	Mean	SD	Min	Max	P value ^a
Acidic reflux events	Neg.	1.0	0.8	0.86	0	2	<0.001
	Pos.	7.0	8.0	5.62	0	20	
Weakly acidic reflux events	Neg.	1.0	1.6	1.42	0	4	0.0216
	Pos.	4.0	7.6	9.73	0	35	
Alkaline reflux events	Neg.	0.0	0.0	0.00	0	0	0.0281
	Pos.	0.0	0.5	1.17	0	4	
Total reflux events	Neg.	2.0	2.4	1.69	0	5	<0.001
	Pos.	13.5	16.0	10.39	6	39	

SD, standard deviation.
^aMann-Whitney test.

Table 4 Comparison of the type and number of esophageal refluxes in patients in the pepsin-negative/positive groups

Esophageal pH-metry results	Pepsin	Median	Mean	SD	Min	Max	P value ^a
Acidic reflux events	Neg.	2.0	2.3	2.00	0	8	0.0004
	Pos.	11.5	14.3	10.66	0	37	
Weakly acidic reflux events	Neg.	7.5	7.5	5.08	1	20	0.1742
	Pos.	9.0	12.8	11.98	2	46	
Alkaline reflux events	Neg.	0.0	0.0	0.00	0	0	0.0261
	Pos.	0.0	0.5	1.17	0	4	
Total reflux events	Neg.	8.5	9.8	5.77	2	23	0.0005
	Pos.	25.0	27.7	15.33	8	58	
Esophageal acid exposure time (min)	Neg.	9.5	12.1	11.19	1	43	0.0002
	Pos.	52.5	56.4	38.67	9	111	
DeMeester score	Neg.	4.6	5.1	4.02	0.3	16.7	0.0015
	Pos.	19.1	19.6	13.55	2.9	42.3	

SD, standard deviation.
^aMann-Whitney test.

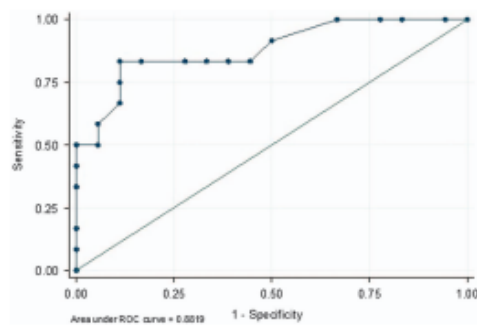


Figure 5 Receiver-operating curve showing the sensitivity and specificity for identifying pepsin in laryngeal mucosa considering the total esophageal refluxes.

tissues and fluids even when reflux has not occurred in the previous several days.¹ Thus, it reflects a long-term situation. Pepsin is also present in all types of LPR (liquid, gas, or mixed) and is detected right in the examined tissue. Furthermore, the presence of pepsin in gastric refluxate is the main pathogenetic factor that causes proteolysis and cell damage. It is important to emphasize that pepsin was detected in the cytoplasm of laryngeal mucosa cells. For pepsin to be present in the cytoplasm, the reflux has to actually reach the larynx and overcome all the cell's protecting mechanisms. Thus, if the cell's cytoplasm is positive for pepsin, it has already damaged the cell and the LPR can be considered to be pathological. Therefore, the presence of pepsin was diagnosed using immunohistochemical analysis. Although it was not possible to establish pepsin concentration values, analysis enables a more precise evaluation of the samples. Other detection methods could provide pepsin concentration values; however, a sample is evaluated by these methods as a complex, and it cannot be established if the sample's pepsin positivity is because of its extracellular or intracellular presence. Small extracellular pepsin concentrations could be normal in

healthy individuals. On the other hand, every pepsin presence in the cell cytoplasm is pathological.

The results of pepsin detection were compared with the results from 24-h pharyngo-esophageal 8-channel intraluminal impedance/2-channel pH monitoring performed in the same patient 1 day before surgery to establish pathological pharyngeal impedance values for LPR. A special impedance catheter for LPR diagnostics was used. The main disadvantage of the catheter is that GERD diagnostics can be difficult. Distal sensors are several centimeters higher in the esophagus than those in a standard esophageal impedance. Therefore, some minor esophageal refluxes that do not reach these slightly higher placed sensors might be missed. On the other hand, LPR diagnostics using this catheter is very precise. Thus, it was almost ideal for our study. Its exact placement was verified using flexible endoscopy in every case.

The participants were divided into two groups according to pepsin positivity/negativity in the laryngeal mucosa. The groups were homogeneous in terms of age, bodyweight, BMI, sex, history of immunodeficiency, allergy, diabetes mellitus, or tobacco exposure. Patients who were positive for pepsin in the laryngeal mucosa were considered to have pathological LPR.

According to the results of our study and previous data, the type of LPR does not play such an important role in its pathogenicity.⁹ There was a significant difference in the number of all types of refluxes in the study. It is likely that pepsin is the main pathogenetic factor present in every type of LPR. It is well known that pepsin is inactive but stable at a pH of 7.0 (alkaline pharyngeal reflux), and that it can be reactivated upon reacidification, retaining 79 ± 11% of its original activity at a pH of 3.0.¹² The reacidification could happen anytime due to acid reflux or simply by eating acidic food.

The total number of all pharyngeal reflux episodes seems to be the most crucial factor for relevant LPR identification. Pharyngeal reflux episodes were relatively rare events in the pepsin-negative group with a median of two episodes. This finding is in agreement with previous studies in asymptomatic patients.⁷⁻⁹ However, there were reports of up to five episodes. The median number of pharyngeal reflux episodes

in the pepsin-positive group was 14 (range 6–39). Statistical analysis confirmed that six or more pharyngeal reflux episodes was the cutoff value for pepsin in the laryngeal mucosa and, thereby, for the diagnosis of relevant LPR affecting the larynx. The sensitivity and specificity for the pathological LPR diagnosis reached 100%. However, the CIs were 73.5–100% and 81.4–100%, respectively. This was due to the small cohort, which is also the main limitation of our study. On the contrary, statistical power for pharyngeal reflux test is 100%. A clear-cut result in the case of pharyngeal reflux is surprising, and the authors suppose that with a growing cohort, the cutoff becomes much less clear.

Data from a slightly higher placed distal sensor are not absolutely comparable understanding that the technique is not optimized for GER evaluation. Statistical analysis revealed that 16 esophageal episodes could be the cut point value for the diagnosis of relevant LPR affecting the larynx. The sensitivity and specificity is lower than that in the case of the detection of pharyngeal reflux episodes. Patients with a higher esophageal acid exposure time and DeMeester Score were more likely to represent pathologic LPR.

Six pharyngeal reflux episodes registered during 24-h impedance–pH monitoring seem to be the cutoff for diagnosing pathological LPR. Therefore, it is possible to suggest establishing of this value as the pathological 24-h impedance value indicating pathological LPR. This result is based on a comparison with pepsin detection in laryngeal mucosa, which is the most accurate way to diagnose LPR. These results must be interpreted with caution, and additional studies with larger cohorts are warranted to confirm these findings.

CONFLICT OF INTEREST

Guarantor of the article: Pavel Komínek, MD, PhD, MBA.

Specific author contributions: Martin Formánek—study concept and design; acquisition of data; analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript; statistical analysis. Debora Jančátová—study concept and design; acquisition of data; analysis and interpretation of data. Pavel Komínek—critical revision of the manuscript for important intellectual content; study supervision. Radoslava Tomanová—acquisition of data. Karol Zeleník—study concept and design; analysis and interpretation of data; and critical revision of the manuscript for important intellectual content.

Financial support: This research was supported by the Ministry of Health, Czech Republic—conceptual development of research organization (FNOs/2014).

Potential competing interests: None.

Acknowledgments. The authors thank Hana Tomášková, PhD, for her help with statistical analysis.

Study Highlights

WHAT IS CURRENT KNOWLEDGE

- ✓ Detecting pathological laryngopharyngeal reflux is challenging.
- ✓ There are still discrepancies in the analysis of pharyngeal impedance tracings.
- ✓ Pathological pharyngeal impedance values need to be clearly established.

WHAT IS NEW HERE

- ✓ Six or more pharyngeal refluxes were the cutoff for relevant/pathological laryngopharyngeal reflux.
- ✓ The results could help in establishing pathological pharyngeal impedance values and improve the accuracy of pharyngoesophageal impedance.

1. Jiang A, Liang M, Su Z et al. Immunohistochemical detection of pepsin in laryngeal mucosa for diagnosing laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope* 2011; 121: 1426–1430.
2. Formánek M, Komínek P, Matoušek P et al. Comparison of three methods used in the diagnosis of extraesophageal reflux in children with chronic otitis media with effusion. *Gastroenterol Res Pract* 2015; 2015: 547959.
3. Crapko M, Kerschner JE, Syring M et al. Role of extra-esophageal reflux in chronic otitis media with effusion. *Laryngoscope* 2007; 117: 1419–1423.
4. Zeleník K, Matoušek P, Formánek M et al. Patients with chronic rhinosinuitis and simultaneous bronchial asthma suffer from significant extraesophageal reflux. *Int Forum Allergy Rhinol* 2015; 5: 944–949.
5. Strim D, Castell D, Dent J et al. Gastro-oesophageal reflux monitoring: review and consensus report on detection and definitions of acid, non-acid, and gas reflux. *Gut* 2004; 53: 1024–1031.
6. Gooli Z, Ishman SL, Book JM et al. Laryngopharyngeal reflux: paradigms for evaluation, diagnosis, and treatment. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2014; 123: 677–685.
7. Oelschläger BK, Quiroga E, Isch JA et al. Gastroesophageal and pharyngeal reflux detection using impedance and 24-hour pH monitoring in asymptomatic subjects: defining the normal environment. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 54–62.
8. Hoppo T, Sanz AF, Nason KS et al. How much pharyngeal exposure is “normal”? Normative data for laryngopharyngeal reflux events using hypopharyngeal multichannel intraluminal impedance (pHII). *J Gastrointest Surg* 2012; 16: 16–25.
9. Zerlib F, Roman S, Bruley Des Varannes S et al. Normal values of pharyngeal and esophageal 24-hour pH impedance in individuals on and off therapy and interobserver reproducibility. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11: 366–372.
10. Hayat JO, Gabiela-Sommer S, Yazaki E et al. Pepsin in saliva for the diagnosis of gastro-oesophageal reflux disease. *Gut* 2014; 64: 361–362.
11. Yadavati R, Adkins C, Jayeola DM et al. Abilities of oropharyngeal pH tests and salivary pepsin analysis to discriminate between asymptomatic volunteers and subjects with symptoms of laryngeal irritation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14: 535–542.
12. Johnston N, Dettmar PW, Bishwokarma B et al. Activity/stability of human pepsin: implications for reflux attributed laryngeal disease. *Laryngoscope* 2007; 117: 1036–1039.



Clinical and Translational Gastroenterology is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

© The Author(s) 2017

Příloha 5: ZELENÍK, Karol, Viktoria HRANKOVA, Adela VRTKOVA, Lucia STANIKOVA, Pavel KOMINEK a Martin FORMANEK*(corresponding author)*. Diagnostic Value of the Peptest(TM) in Detecting Laryngopharyngeal Reflux. Journal of Clinical Medicine [online]. 2021, 10(13), 2996. Dostupné z: doi:10.3390/jcm10132996. (IF 2020 = 4,242; Q2)

Article

Diagnostic Value of the Peptest™ in Detecting Laryngopharyngeal Reflux

Karol Zeleník ¹ , Viktória Hránková ¹, Adéla Vrtková ² , Lucia Staníková ¹, Pavel Komínek ¹ and Martin Formánek ^{1,*} 

¹ Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Faculty of Medicine, University Hospital of Ostrava, 708 52 Ostrava, Czech Republic; karol.zelenik@fno.cz (K.Z.); viktorija.hrankova@fno.cz (V.H.); lucia.stanikova@fno.cz (L.S.); pavel.kominek@fno.cz (P.K.)
² Department of Applied Mathematics, Faculty of Electrical Engineering and Computer Science, VSB—Technical University of Ostrava, 708 00 Ostrava, Czech Republic; adela.vrtkova@vsb.cz
* Correspondence: martin.formanek@fno.cz

Abstract: Background: The Peptest™ is a non-invasive diagnostic test for measuring the pepsin concentration in saliva, which is thought to correlate with laryngopharyngeal reflux (LPR). The aim of this study was to investigate the diagnostic value of the Peptest in detecting LPR based on 24-h multichannel intraluminal impedance-pH (MII-pH) monitoring using several hypopharyngeal reflux episodes as criterion for LPR. Methods: Patients with suspected LPR were examined with the Reflux Symptom Index (RSI), Reflux Finding Score (RFS), fasting Peptest, and MII-pH monitoring. We calculated the accuracy, sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of the Peptest, RSI, and RFS based on the threshold of one and six hypopharyngeal reflux episodes. Results: Altogether, the data from 46 patients were analyzed. When one hypopharyngeal reflux episode was used as a diagnostic threshold for LPR, the accuracy, sensitivity, specificity, PPV, and NPV were, respectively, as follows: 35%, 33%, 100%, 100%, and 3%, for the Peptest; 39%, 40%, 0%, 95%, and 0%, for the RSI; and 57%, 58%, 0%, 96%, and 0%, for the RFS. The accuracy, sensitivity, specificity, PPV, and NPV of the Peptest for diagnosing gastroesophageal reflux disease (GERD) were 46%, 27%, 63%, 40.0%, and 48%, respectively. Conclusions: A positive Peptest is highly supportive of a pathological LPR diagnosis. However, a negative test could not exclude LPR.

Keywords: laryngopharyngeal reflux; gastroesophageal reflux disease; Peptest™; 24-h multichannel intraluminal impedance-pH; Reflux Finding Score



Citation: Zeleník, K.; Hránková, V.; Vrtková, A.; Staníková, L.; Komínek, P.; Formánek, M. Diagnostic Value of the Peptest™ in Detecting Laryngopharyngeal Reflux. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2996. <https://doi.org/10.3390/jcm10132996>

Academic Editor: Petros D. Karkos

Received: 19 May 2021

Accepted: 1 July 2021

Published: 5 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Laryngopharyngeal reflux (LPR) is often involved in the development of laryngeal, pharyngeal, rhinological, and otological conditions [1–4]. The precise diagnosis of LPR remains challenging, particularly in patients with mild to moderate symptoms, because the symptoms and findings are nonspecific, and an accepted gold standard does not exist, as every diagnostic method shows false positive and false negative results. Therefore, multiple methods are used for most patients. The most validated diagnostic tool, which is deemed to be the “gold standard”, is the 24-h multichannel intraluminal impedance-pH (MII-pH) monitoring tool, which provides useful information about the severity, number, and type (acid, nonacid, mixed, upright/recumbent) of hypopharyngeal reflux episodes. However, MII-pH monitoring might be inconvenient for some patients, is costly, and is not available at all institutions [1]. Moreover, the possibility that probe insertion might influence the LRP could not be completely excluded. Therefore, new non-invasive diagnostic approaches have been developed, including the detection of pepsin in saliva samples with the Peptest™ (RD Biomed, Hull, UK) [5]. The Peptest measures the pepsin concentration in saliva, which is thought to correlate with recent (i.e., within hours) hypopharyngeal reflux episodes. The Peptest has been widely used around the world as a non-invasive, economic, and

easy method for diagnosing LPR. However, its diagnostic value has been questioned, and currently, it is an issue of ongoing debate. In fact, no single study has evaluated the diagnostic value of the Peptest compared to that of MII-pH monitoring based on the LPR diagnostic criterion, which is the number of hypopharyngeal reflux episodes detected.

The present study aimed to investigate the diagnostic value of the Peptest compared to that of the gold standard LPR diagnosis based on MII-pH monitoring. To provide a more in-depth analysis, we used two different criteria for diagnosing LPR: the detection of one or six hypopharyngeal reflux episodes. Moreover, the diagnostic value of the Peptest was compared to those of the Reflux Symptom Index (RSI) and the Reflux Finding Score (RFS). Furthermore, we investigated the diagnostic value of the Peptest for diagnosing gastroesophageal reflux (GERD) based on a positive DeMeester score. These results were expected to provide a basis for using the Peptest for LPR screening in situations where performing the MII-pH is not possible.

2. Materials and Methods

This prospective study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki, the requirements of good clinical practice, and all applicable regulatory requirements. It was approved by the Institutional Review Board and registered at ClinicalTrials.com, identifier: NCT03904758. Written informed consent was obtained from all participants before any procedure was initiated.

2.1. Patient Selection, Inclusion/Exclusion Criteria, and Basic Examination

Consecutive adult patients with symptoms and signs of LPR were prospectively recruited from April 2019 to December 2020. Exclusion criteria were as follows: history of head and neck cancer, patients with diagnosed esophageal motility disorder, patients with an upper respiratory infection in the prior 4 weeks, smokers, patients with an alcohol dependency, and patients that refused to stop anti-reflux medication for the purpose of the study.

Enrolled patients were asked to complete a questionnaire for the RSI. Then, a flexible laryngoscopy was performed to determine the RFS. For performing the RFS, we randomly selected one of two physicians experienced at diagnosing LPR.

2.2. Pepsin Sample Collection

The pepsin concentration was measured in saliva samples with the Peptest. Patients were instructed to keep their standard food and drink regimen the day before examination and fast overnight before examination. Patients provided a saliva sample (1–5 mL; throat sputum) at the office, the morning after an overnight fast, and directly before introducing the MII-pH probe. The saliva sample was collected in a 30 mL universal sample collection tube and immediately analyzed with a standardized procedure described previously [6].

2.3. Multichannel Intraluminal Impedance-pH Monitoring

Patients that were taking anti-reflux medication chronically were asked to stop taking the medication before the study as follows: proton pump inhibitor therapy was stopped for 1 week; H₂ blockers were stopped for 48 h; and drugs containing CaCO₃ were stopped for 1 day before the study. Furthermore, all patients were asked to maintain normal daily activities. We performed MII-pH monitoring with the Digitrapper pH-Z Testing System (Medtronic, Minneapolis, MN, USA). A VersaFlex LPR ZNID22 + 8R impedance catheter (Medtronic, Minneapolis, MN, USA) was equipped with pH sensors located at 0 cm (proximal) and 22 cm (distal), and eight impedance rings located at −3, −1, 1, 13, 15, 17, 20, and 23 cm from the proximal pH sensor. Before recording, the catheter was calibrated with buffer solutions at pH values of 4.0 and 7.0. The proximal pH sensor was placed in the hypopharynx in the retrocricoid region, 2 cm above the upper esophageal sphincter, with flexible laryngoscopy guidance. A Digitrapper Recorder (Medtronic, Minneapolis, MN, USA) was used to record the data. Patients were instructed to record the time they spent

eating, drinking, and in a horizontal position. Two physicians experienced in the technique manually analyzed the tracings with AccuView Reflux Software (Medtronic, Minneapolis, MN, USA) and a standardized method [7].

A hypopharyngeal reflux event was defined as an episode that was detected by two impedance sensors in the hypopharynx. An acidic event consisted of a gaseous or liquid reflux with a pH ≤ 4.0 . A non-acid event was a gaseous or liquid reflux with a pH > 4.0 . Accordingly, a group of non-acid reflux covers weakly acidic, neutral, and alkaline reflux events. We defined acid, non-acid, and mixed LPR according to the work of Lechien et al. [8], based on the ratio of the number of acid reflux episodes to the number of non-acid reflux episodes. Acid LPR was defined as a ratio > 2 ; non-acid LPR was defined as a ratio < 0.5 ; and mixed reflux LPR was defined as a ratio of 0.51 to 2.0 [8]. For this study, one hypopharyngeal reflux event and then 6 hypopharyngeal reflux episodes were considered as the threshold for pathological LPR (for more details, see Section 2.4 below).

2.4. Statistical Analysis

Demographic parameters are expressed as the median and interquartile range (IQR), the absolute frequency, or the relative frequency (%). The significance of differences between groups was tested with the Mann-Whitney test or the chi-square test of independence for contingency tables. According to a study by Hoppe et al., the LPR diagnosis was first based on the occurrence of ≥ 1 hypopharyngeal reflux episode detected with MII-pH [7]. The diagnostic accuracies of the Peptest, RSI, and RFS were evaluated in terms of the accuracy, sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) with corresponding confidence intervals. Then, to evaluate the diagnostic value of the Peptest with more restrictive criteria, we performed the same calculations for the Peptest, RSI, and RFS, but the diagnosis was based on a threshold of six hypopharyngeal reflux episodes detected with MII-pH monitoring. This latter threshold was based on a previous study by Formánek et al. [9]. Moreover, we calculated the evolution of the accuracy, sensitivity, specificity, PPV, and NPV of the Peptest over a span of thresholds that ranged from 1 to 70 hypopharyngeal reflux episodes. Finally, the diagnostic value of the Peptest in diagnosing GERD was determined based on the threshold for the DeMeester score. The significance level was set to 0.05, and the statistical analysis was performed using R software, version 4.0.3 (R foundation, Vienna, Austria).

3. Results

We enrolled 52 consecutive patients with suspected LPR in the study. Six patients were excluded (four of them did not tolerate the MII-pH probe, and in two patients, the record of MII-pH was broken and could not be used), and 46 were analyzed (Table 1).

Table 1. Characteristics of the study group.

Characteristic	Peptest (+) (n = 15)	Peptest (−) (n = 31)	Total (n = 46)	p
Age (years)	48 (38–64)	49 (37–62)	49 (36–62)	0.953
BMI (kg/m ²)	23.7 (23.2–26.6)	24.2 (21.8–27.7)	24.2 (22.1–27.1)	0.699
Sex				
female	10 (67)	20 (65)	30 (65)	> 0.999
male	5 (33)	11 (35)	16 (35)	

Values are the median (interquartile range) or absolute and relative frequencies (in %), as indicated. p-values were evaluated with the Mann-Whitney test or the chi-square test of independence. BMI—Body mass index.

When one hypopharyngeal reflux episode was used as the diagnostic threshold for LPR, the accuracy, sensitivity, specificity, PPV, and NPV for the Peptest (Table 2) were as follows: 35%, 33%, 100%, 100%, and 3%, respectively. In comparison, the results for the RSI were as follows: 39%, 40%, 0%, 95%, and 0%, respectively; and the results for the RFS were as follows: 57%, 58%, 0%, 96%, and 0%, respectively (Table 2). When the diagnostic threshold for LPR was six hypopharyngeal reflux episodes, the Peptest accuracy, sensitivity,

and NPV increased slightly, and its specificity and PPV decreased slightly (Table 3). The RFS had a higher sensitivity than that of the Peptest when either one or six hypopharyngeal reflux episodes were used as the diagnostic threshold for LPR. When the LPR threshold was changed from 1 to 70 episodes, the best accuracy, sensitivity, specificity, PPV, and NPV for the Peptest were observed with an LPR threshold of 16 episodes detected with MII-pH. However, despite this, the results were only moderate (Figure 1). The diagnostic accuracy, sensitivity, specificity, PPV, and NPV for the Peptest in diagnosing GERD were as follows: 48%, 27%, 63%, 40%, and 48%, respectively (Table 4).

Table 2. Diagnostic evaluations of the Peptest, RSI, and RFS in patients with (+) or without (−) a laryngopharyngeal reflux diagnosis based on a threshold of one hypopharyngeal reflux episode.

Parameter	Peptest (+)	Peptest (−)	RSI (+)	RSI (−)	RFS (+)	RFS (−)
LPR (+)	15	30	18	27	26	19
LPR (−)	0	1	1	0	1	0
Accuracy	35(21.4; 50.2)		39 (25.1; 54.6)		57 (41.1; 71.1)	
Sensitivity	33 (20.0; 49.0)		40 (25.7; 55.7)		58 (42.2; 72.3)	
Specificity	100 (2.5; 100.0)		0 (0.0; 97.5)		0 (0.0; 97.5)	
PPV *	100 (78.2; 100.0)		95 (74.0; 99.9)		96 (81.0; 99.9)	
NPV	3 (0.1; 16.7)		0 (0.0; 12.8)		0 (0.0; 17.6)	

Values are the number of patients or diagnostic measure with the 95% confidence interval, as indicated. RSI—Reflux Symptom Index, RFS—Reflux Finding Score, LPR—laryngopharyngeal reflux, PPV—positive predictive value, NPV—negative predictive value. *—important result.

Table 3. Diagnostic evaluations of the Peptest, RSI, and RFS in patients with (+) or without (−) a laryngopharyngeal reflux diagnosis based on a threshold of six hypopharyngeal reflux episodes.

Parameter	Peptest (+)	Peptest (−)	RSI (+)	RSI (−)	RFS (+)	RFS (−)
LPR (+)	13	22	13	22	20	15
LPR (−)	2	9	6	5	7	4
Accuracy	48 (32.9; 63.1)		39 (25.1; 54.6)		52 (36.9; 67.1)	
Sensitivity	37 (21.5; 55.1)		37 (21.5; 55.1)		57 (39.4; 73.7)	
Specificity	82 (48.2; 97.7)		46 (16.7; 76.6)		36 (10.9; 69.2)	
PPV *	87 (59.5; 98.3)		68 (43.4; 87.4)		74 (53.7; 88.9)	
NPV	29 (14.2; 48.0)		19 (6.3; 38.1)		21 (6.1; 45.6)	

Values are the number of patients or diagnostic measure with the 95% confidence interval, as indicated. RSI—Reflux Symptom Index, RFS—Reflux Finding Score, LPR—laryngopharyngeal reflux, PPV—positive predictive value, NPV—negative predictive value. *—important result.

Table 4. Evaluation of the Peptest for the diagnosis of gastroesophageal reflux disease in patients with (+) or without (−) gastroesophageal reflux disease based on the DeMeester score.

Parameter	Peptest (+)	Peptest (−)
DeMeester score (+)	6	16
DeMeester score (−)	9	15
Accuracy	46 (30.9; 61.0)	
Sensitivity	27 (10.7; 50.2)	
Specificity	63 (40.6; 81.2)	
PPV	40 (16.3; 67.7)	
NPV	48 (30.2; 66.9)	

Values are the number of patients or diagnostic measure with the 95% confidence interval, as indicated. PPV—positive predictive value, NPV—negative predictive value.

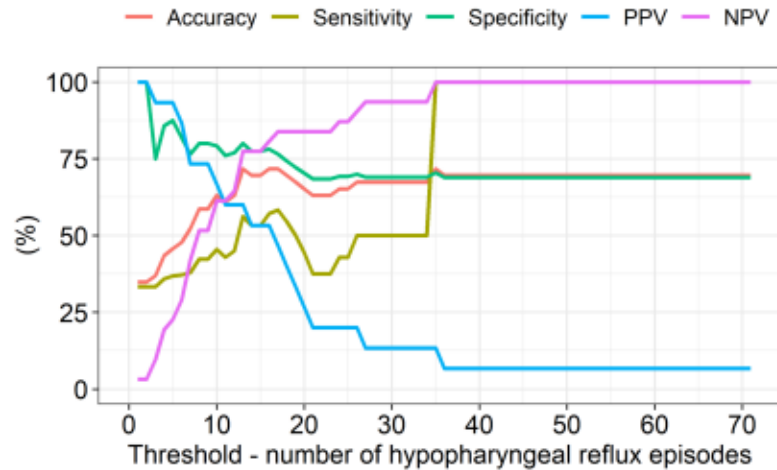


Figure 1. Evolution of the accuracy, sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of the Peptest when the threshold for a laryngopharyngeal reflux diagnosis was changed incrementally from 1 to 70 episodes.

4. Discussion

Many medical specialists (e.g., general practitioners, allergists, chest physicians, gastroenterologists, otolaryngologists, and others) widely use the Peptest around the world, which highlights the importance of this study. To date, this study was the first to compare the diagnostic value of the Peptest to that of MII-pH monitoring based on appropriate diagnostic criteria for LPR.

Previous studies compared the diagnostic value of the Peptest to those of the RSI and RFS [10–12]. Barona et al. found 98% specificity and 40% sensitivity for the Peptest when saliva samples were collected from fasting subjects. In studies that performed two Peptest examinations (one fasting and one an hour after the main meal), the Peptest showed 95% specificity and 48% sensitivity compared to the RSI. However, studies have shown that the RSI was not specific for LPR, and its diagnostic weaknesses have been discussed repeatedly [1,13]. Therefore, a comparison between the Peptest and the RSI cannot be taken as sufficient evidence of the diagnostic value of the Peptest. Similar results were found when the Peptest was compared to the RFS [12]. However, the RFS is also nonspecific, and laryngeal signs cannot be used to determine reflux changes in many situations (e.g., in smokers, after radiation, after an upper airway infection, etc.).

Other studies evaluated the diagnostic value of the Peptest compared to that of MII-pH or pH monitoring [6,14,15]. However, all those studies used the diagnostic criteria for GERD, not LPR. Dy et al. compared the MII-pH and the Peptest with criteria for GERD in a pediatric population. They stated that “pepsin lacks sensitivity as a diagnostic tool for evaluating extraesophageal reflux disease” [14]. Similarly, other authors employed the “gastroenterological” methodology when performing MII-pH monitoring. In that methodology, the proximal sensor was positioned 5 cm above the level of lower esophageal sphincter [6,15]. Nevertheless, it has been repeatedly shown that GERD and LPR are different diagnoses, and a GERD diagnosis does not prove or exclude LPR [1]. Therefore, it is not reasonable to investigate the diagnostic value of the Peptest in diagnosing LPR by comparing it to GERD MII-pH criteria.

Other studies that used MII-pH monitoring to evaluate hypopharyngeal reflux episodes (LPR criteria) employed a method other than the Peptest for detecting pepsin in saliva [16,17]. Na et al. performed ELISA to examine the total pepsin levels in saliva collected upon waking.

They found that pepsin levels were significantly higher in patients with LPR symptoms and demonstrated at least one episode of proximal esophageal reflux during MII-pH monitoring. Furthermore, they found that the average pepsin level upon waking was higher than that measured at any other time. They concluded that measuring pepsin levels in the saliva upon waking may be a useful method for diagnosing LPR [16]. A similar study was conducted by Kimara et al., who performed MII-pH monitoring by placing the proximal sensor above the level of the upper esophageal sphincter. Those authors observed a significant correlation between salivary pepsin levels measured (with ELISA) in waking samples and MII-pH measurements [17]. Consistent with the study conducted by Na et al., they found that pepsin was most frequently detected in the specimen collected upon waking [17]. Although those results are interesting and promising, they did not predicate the diagnostic value of the Peptest.

A meta-analysis conducted by Wang et al. included some studies that compared signs (RSI) and symptoms (RFS), which were not specific for LPR, and other studies that used MII-pH or pH monitoring with diagnostic criteria for GERD, not LPR. Therefore, based on those pooled data, the sensitivity of 64% and specificity of 68% found for the Peptest in their meta-analysis were burdened with significant bias; consequently, the results of that meta-analysis must be interpreted with great caution [18].

The best-designed study on the subject of LPR was conducted by Bobin et al. Those authors concluded that they could not identify any significant associations between the RFS, the key symptoms observed during the test period, the MII-pH findings (with LPR methodology), the gastrointestinal endoscopy characteristics, or the pepsin concentrations in saliva samples determined with the Peptest [19]. Some “raw” data for testing the diagnostic value of the Peptest compared to that of MII-pH are missing. Consequently, we could not compare results between that study and the present study.

Another interesting study, conducted by Lechien et al., examined patients with the Peptest and with the MII-pH monitoring based on correct LPR methodology [20]. Those authors divided the patients into positive and negative Peptest groups. They concluded that the occurrence of pharyngeal reflux events during MII-pH monitoring was similar between groups. However, the diagnostic value of the Peptest was not stated [20].

To the best of our knowledge, no previous study has compared the Peptest to MII-pH monitoring based on diagnostic criteria for LPR (i.e., the number of hypopharyngeal reflux episodes) and provided data on diagnostic value of the Peptest. Many factors can influence the results of a comparison between the Peptest and MII-pH monitoring, but two factors are most important: first, the MII-pH protocol, probe placement, and criteria; second, the time of saliva collection for the pepsin analysis and diet within a 24 h period before sample collection [21,22].

To date, there is no consensus about the best time for collecting the saliva sample. In fact, there is significant heterogeneity among studies concerning the timing of saliva collection, and the results differ among the different studies [21,22]. However, well-designed studies from the last few years have supported the notion that saliva for pepsin examinations should be collected upon waking, and we used this methodology in the present study [16,17,20,22]. Regarding the diet within the 24 h period before saliva collection, it was confirmed by Lechien et al. that the saliva pepsin concentration was significantly associated with foods and beverages consumed during the evening dinner and during the testing period [22]. In our study, patients were instructed to have their standard food and drink regimen the day before examination and during MII-pH study to determine whether their standard diet and habits lead to LPR. We are aware that this approach can lead to some bias. On the other hand, information provided by tests reflect the “real situation” of patients.

There is a relatively strong consensus regarding the MII-pH protocol for diagnosing LPR. It has been shown that LPR can be diagnosed with the highest degree of exactness when the upper impedance and pH probes are positioned above the level of the upper esophageal sphincter and the number of hypopharyngeal LPR episodes is counted. How-

ever, a strong consensus has not been reached about how to interpret the hypopharyngeal data (extraesophageal reflux episodes) provided by MII-pH monitoring [1]. The widely accepted criterion for diagnosing pathological LPR is at least one hypopharyngeal reflux episode detected with MII-pH monitoring, as described by Hoppe et al. [7]. That threshold was established by examining 34 healthy individuals. On the other hand, it has been shown that some pharyngeal reflux episodes occur in healthy individuals. Oelschlager et al. reported a median of five pharyngeal reflux episodes in 10 asymptomatic controls during 24 h pH monitoring [23]. Additionally, Zerbib et al. detected 32 pharyngeal reflux events during 24 h pH monitoring in 12 healthy subjects, and 12 pharyngeal reflux events occurred in 1 subject. Nevertheless, the median number of pharyngeal reflux events was zero [24]. These discrepancies clearly demonstrated the challenges involved in clinical interpretations of MII-pH data in the diagnosis of LPR. Thus, we need accurate, reproducible diagnostic criteria and a broader consensus.

Accordingly, in the present study, we evaluated the diagnostic value of the Peptest with more than one criterion. We employed two different LPR thresholds: one and six hypopharyngeal reflux episodes, as described by Hoppe et al. [7] and Formánek et al. [9], respectively. Both analyses showed that the Peptest had high PPV but low sensitivity and NPV.

There are some unresolved issues concerning the role of pepsin examinations in saliva. First, it has been demonstrated that pepsin may enter epithelial cells and become reactivated in the Golgi system, where the pH is 5.0 [19,25]. The reactivation of pepsin may lead to mitochondrial and Golgi complex damage and, subsequently, cell destruction [19,25]. Therefore, the saliva pepsin concentration might not reflect the actual concentration of active pepsin in laryngopharyngeal tissues. In other words, only a limited proportion of harmful pepsin might be measurable with the Peptest. On the other hand, we hypothesize that the presence of pepsin in saliva might reflect relatively severe reflux, because it is unlikely that all extracellular pepsin is immediately internalized into mucosal cells. Second, pepsin is probably only one of many gastrointestinal enzymes (trypsin, lipase, and bile salts) that can cause LPR symptoms. Its role in the development of LPR must be studied more in the future. Third, the level of saliva pepsin in the morning is likely to reflect the quantity of pepsin refluxed over the last 12 to 24 h. In other words, morning pepsin levels are likely to be associated with the foods and beverages consumed for dinner the day before and their refluxogenic potential [22,26]. Therefore, it is important to advise patients to maintain their normal daily and food habits on the day before the examination. More precisely, they should be instructed not to fast or indulge on the day before the saliva examination.

A limitation of our study is the relatively small number of included patients. Moreover, the low number of patients with LPR-negative results on MII-pH makes the results of some statistical results (particularly, specificity of the Peptest) inconclusive. In addition, the keeping of patients on regular diet regimen before saliva collection for Peptest examination can cause some bias and was discussed above. In addition, patient selection bias cannot be completely reduced when performing studies on LPR. Furthermore, a limitation of all current studies on LPR, including ours, is the lack of a gold standard for the diagnosis of LPR and a consensus on how many LPR reflux episodes are pathological. We attempt to reduce this kind of bias using two thresholds of hypopharyngeal reflux events in analysis.

Despite its limitations, our study results suggested that a positive Peptest should be considered a strong indication that the patient has LPR, and the patient should be treated accordingly. Therefore, the Peptest could serve as a good screening test for physicians that cannot visualize the larynx, such as general practitioners, allergists, gastroenterologists, and chest physicians, in cases that do not require an upper gastrointestinal endoscopy or bronchoscopy. Another advantage of using the Peptest in the COVID-19 era is its non-invasive nature when compared with flexible laryngoscopy or MII-pH testing. In contrast, a negative Peptest cannot rule out LPR. Therefore, when the Peptest is negative, the patient should be examined by otolaryngologist with the RFS, which has 57% sensitivity

according to our findings, or the Reflux Sign Assessment, which is expected to have greater sensitivity [8].

To obtain more robust data and more conclusive results on the Peptest's diagnostic value, future studies on the subject should be of multicentric nature. Important information regarding whether the Peptest can predict a response to treatment (diet, lifestyle modification, and medication) is needed. This point should be studied in the close future.

5. Conclusions

A positive Peptest is very specific for diagnosing LPR, whereas a negative Peptest cannot exclude LPR. Therefore, the Peptest could serve as a screening test for physicians who cannot visualize the larynx, for whatever reason.

Author Contributions: Conceptualization, K.Z. and M.F.; methodology, K.Z., V.H. and A.V.; software, A.V.; validation, K.Z., M.F. and P.K.; formal analysis, A.V. and K.Z.; investigation, V.H., L.S. and K.Z.; resources, M.F.; data curation, V.H. and K.Z.; writing—original draft preparation, K.Z.; writing—review and editing, V.H. and M.F.; visualization, L.S.; supervision, M.F.; project administration, V.H.; funding acquisition, M.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Ministry of Health, Czech Republic, Conceptual Development of Research Organization, MH CZ-DRO-FNOs/2018.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of University Hospital Ostrava (protocol code 325/2018 and date of approval 24 April 2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lechien, J.R.; Akst, L.M.; Hamdan, A.L.; Schindler, A.; Karkos, P.D.; Barillari, M.R.; Calvo-Henriquez, C.; Crevier-Buchman, L.; Finck, C.; Eun, Y.-G.; et al. Evaluation and Management of Laryngopharyngeal Reflux Disease: State of the Art Review. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2019**, *160*, 762–782. [\[CrossRef\]](#)
2. Zeleník, K.; Matoušek, P.; Urban, O.; Schwarz, P.; Stárek, I.; Komínek, P. Globus pharyngeus and extraesophageal reflux: Simultaneous pH < 4.0 and pH < 5.0 analysis. *Laryngoscope* **2010**, *120*, 2160–2164.
3. Formánek, M.; Zeleník, K.; Komínek, P.; Matoušek, P. Diagnosis of extraesophageal reflux in children with chronic otitis media with effusion using Peptest. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **2015**, *79*, 677–679. [\[CrossRef\]](#)
4. Zeleník, K.; Matoušek, P.; Formánek, M.; Urban, O.; Komínek, P. Patients with chronic rhinosinusitis and simultaneous bronchial asthma suffer from significant extraesophageal reflux. *Int. Forum. Allergy Rhinol.* **2015**, *5*, 944–949. [\[CrossRef\]](#)
5. Bor, S.; Capanoglu, D.; Vardar, R.; Woodcock, A.D.; Fisher, J.; Dettmar, P.W. Validation of Peptest™ in Patients with Gastro-Esophageal Reflux Disease and Laryngopharyngeal Reflux Undergoing Impedance Testing. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **2019**, *28*, 383–387. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Hayat, J.O.; Gabieta-Somnez, S.; Yazaki, E.; Kang, J.-Y.; Woodcock, A.; Dettmar, P.; Mabary, J.; Knowles, C.H.; Sifrim, D. Pepsin in saliva for the diagnosis of gastro-oesophageal reflux disease. *Gut* **2015**, *64*, 373–380. [\[CrossRef\]](#)
7. Hoppo, T.; Sanz, A.F.; Nason, K.S.; Carroll, T.L.; Rosen, C.; Normolle, D.P.; Shaheen, N.J.; Luketich, J.D.; Jobe, B.A. How much pharyngeal exposure is “normal”? Normative data for laryngopharyngeal reflux events using hypopharyngeal multichannel intraluminal impedance (HMII). *J. Gastrointest. Surg.* **2012**, *16*, 16–24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Lechien, J.R.; Rodríguez Ruiz, A.; Dequanter, D.; Bobin, F.; Mouawad, F.; Muls, V.; Saussez, S. Validity and Reliability of the Reflux Sign Assessment. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **2020**, *129*, 313–325. [\[CrossRef\]](#)
9. Formánek, M.; Jančatová, D.; Komínek, P.; Tomanová, R.; Zeleník, K. Comparison of Impedance and Pepsin Detection in the Laryngeal Mucosa to Determine Impedance Values that Indicate Pathological Laryngopharyngeal Reflux. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2017**, *8*, e123. [\[CrossRef\]](#)
10. Barona-Lleo, L.; Guzman, R.B.-D.; Krstulovic, C. The Diagnostic Usefulness of the Salivary Pepsin Test in Symptomatic Laryngopharyngeal Reflux. *J. Voice* **2019**, *33*, 923–928. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

11. Yadlapati, R.; Adkins, C.; Jaiyeola, D.-M.; Lidder, A.K.; Gawron, A.J.; Tan, B.K.; Shabeeb, N.; Price, C.P.; Agrawal, N.; Ellenbogen, M.; et al. Abilities of Oropharyngeal pH Tests and Salivary Pepsin Analysis to Discriminate Between Asymptomatic Volunteers and Subjects with Symptoms of Laryngeal Irritation. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *14*, 535–542. [[CrossRef](#)]
12. Spyridoulas, A.; Lillie, S.; Vyas, A.; Fowler, S.J. Detecting laryngopharyngeal reflux in patients with upper airways symptoms: Symptoms, signs or salivary pepsin? *Respir. Med.* **2015**, *109*, 963–969. [[CrossRef](#)]
13. DeVore, E.K.; Chan, W.W.; Shin, J.J.; Carroll, T.L. Does the Reflux Symptom Index Predict Increased Pharyngeal Events on HEMII-pH Testing and Correlate with General Quality of Life? *J. Voice* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dy, F.; Amirault, J.; Mitchell, P.D.; Rosen, R. Salivary Pepsin Lacks Sensitivity as a Diagnostic Tool to Evaluate Extraesophageal Reflux Disease. *J. Pediatr.* **2016**, *177*, 53–58. [[CrossRef](#)]
15. Weitzendorfer, M.; Antoniou, S.A.; Schredl, P.; Witzel, K.; Weitzendorfer, L.C.; Majerus, A.; Koch, O.O. Pepsin and oropharyngeal pH monitoring to diagnose patients with laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope* **2020**, *130*, 1780–1786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Na, S.Y.; Kwon, O.E.; Lee, Y.C.; Eun, Y.G. Optimal timing of saliva collection to detect pepsin in patients with laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope* **2016**, *126*, 2770–2773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Klimara, M.J.; Johnston, N.; Samuels, T.L.; Visotcky, A.M.; Poetker, D.M.; Loehr, T.A.; Bock, J.M. Correlation of salivary and nasal lavage pepsin with III-pH testing. *Laryngoscope* **2020**, *130*, 961–966. [[CrossRef](#)]
18. Wang, J.; Zhao, Y.; Ren, J.; Xu, Y. Pepsin in saliva as a diagnostic biomarker in laryngopharyngeal reflux: A meta-analysis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **2018**, *275*, 671–678. [[CrossRef](#)]
19. Bobin, F.; Journe, F.; Lechien, J.R. Saliva pepsin level of laryngopharyngeal reflux patients is not correlated with reflux episodes. *Laryngoscope* **2020**, *130*, 1278–1281. [[CrossRef](#)]
20. Lechien, J.R.; Bobin, F.; Dequanter, D.; Rodriguez, A.; Le Bon, S.; Horoi, M.; Saussez, S. Does Pepsin Saliva Concentration (Peptest™) Predict the Therapeutic Response of Laryngopharyngeal Reflux Patients? *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Calvo-Henriquez, C.; Ruano-Ravina, A.; Vaamonde, P.; Martinez-Capoccioni, G.; Martín-Martín, C. Is Pepsin a Reliable Marker of Laryngopharyngeal Reflux? A Systematic Review. *Otolaryngol. Head Neck. Surg.* **2017**, *157*, 385–391. [[CrossRef](#)]
22. Lechien, J.R.; Bobin, F.; Muls, V.; Horoi, M.; Thill, M.P.; Dequanter, D.; Saussez, S. Saliva Pepsin Concentration of Laryngopharyngeal Reflux Patients Is Influenced by Meals Consumed Before the Samples. *Laryngoscope* **2021**, *131*, 350–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Oelschlager, B.K.; Quiroga, E.; Isch, J.A.; Cuenca-Abente, F. Gastroesophageal and pharyngeal reflux detection using impedance and 24-hour pH monitoring in asymptomatic subjects: Defining the normal environment. *J. Gastrointest. Surg.* **2006**, *10*, 54–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zerbib, F.; Roman, S.; Varannes, S.B.D.; Gourcerol, G.; Coffin, B.; Ropert, A.; Lepicard, P.; Mion, F. Normal values of pharyngeal and esophageal 24-hour pH impedance in individuals on and off therapy and interobserver reproducibility. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *11*, 366–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Johnston, N.; Wells, C.W.; Samuels, T.; Blumin, J.H. Pepsin in nonacidic refluxate can damage hypopharyngeal epithelial cells. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **2009**, *118*, 677–685. [[CrossRef](#)]
26. Lechien, J.R.; Bobin, F.; Mouawad, F.; Zelenik, K.; Calvo-Henriquez, C.; Chiesa-Estomba, C.M.; Saussez, S. Development of scores assessing the refluxogenic potential of diet of patients with laryngopharyngeal reflux. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **2019**, *276*, 3389–3404. [[CrossRef](#)]


Příloha 6: STANIKOVA, L., R. WALDEROVA, D. JANCATOVA, M. FORMANEK, K. ZELENIK a Pavel KOMINEK. Comparison of narrow band imaging and the Storz Professional Image Enhancement System for detection of laryngeal and hypopharyngeal pathologies. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* [online]. 2018, 275(7), 1819–1825. ISSN 0937-4477. Dostupné z: doi:10.1007/s00405-018-4987-3. (IF 2018 = 1,750; Q2)

European Archives of Oto-Rhino-Laryngology (2018) 275:1819–1825
https://doi.org/10.1007/s00405-018-4987-3

LARYNGOLOGY



Comparison of narrow band imaging and the Storz Professional Image Enhancement System for detection of laryngeal and hypopharyngeal pathologies

L. Staníková^{1,2} · R. Walderová¹ · D. Jančatová^{1,2} · M. Formánek^{1,2} · K. Zeleník^{1,2} · Pavel Komínek^{1,2} 

Received: 2 March 2018 / Accepted: 26 April 2018 / Published online: 30 April 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Objective The aim of this study was to compare narrow band imaging (NBI) endoscopy and Storz Professional Image Enhancement System (SPIES) in observing epithelial and/or subepithelial microvascular irregularities and pathologies.

Methods A total of 73 patients with laryngeal or hypopharyngeal lesions were investigated using high-definition NBI endoscopy preoperatively in local anesthesia and using SPIES system intraoperatively in general anesthesia from August 2016 to October 2017. Superficial vascular structures were classified preoperatively (NBI) and intraoperatively (SPIES) according to descriptive guidelines of vascular changes by Arens. All lesions were endoscopically evaluated and divided according to the histological examination into four groups (A—benign lesions, B—recurrent respiratory papillomatosis, C—low-grade dysplasia, D—high-grade dysplasia, carcinoma in situ or invasive squamous cell carcinoma), and results were compared with NBI and SPIES optical biopsy.

Results Benign lesions (polyps, cysts, chronic inflammation, hyperkeratosis) were histologically confirmed in 26/73 (35.6%) cases and identified by NBI in 20/26 lesions (76.9%) and in 20/26 cases (76.9%) by SPIES, respectively. Recurrent respiratory papillomatosis was confirmed in 16/73 (21.9%) and detected in 15/16 cases (93.8%) by NBI and in 16/16 cases (100.0%) by SPIES. Low-grade dysplasia (mild and moderate dysplasia) was histologically detected in 7/73 patients (9.6%) and accurately identified by NBI in 6/7 (85.7%) and by SPIES in 6/7 (85.7%) cases, respectively. Histopathological features of severe dysplasia, carcinoma in situ or invasive squamous cell carcinoma were detected in 24/73 (32.9%) patients. According to the NBI endoscopy the suspected vascular neoangiogenesis was recognized in 19/24 cases (79.2%) and in 18/24 cases (75.0%) using SPIES endoscopy. Sensitivity and specificity of NBI endoscopy and SPIES system in correct prediction of histological diagnosis of already detected lesions were 83.0 and 98.0% and 86.0 and 96.0%, respectively. Results of NBI/SPIES endoscopy and histopathological features of laryngeal and hypopharyngeal lesions were compared and the level of agreement was 81.43%, kappa index $\kappa=0.7428$ (95% CI 0.682–0.832) ($p<0.001$) by NBI endoscopy and 81.16%, kappa index $\kappa=0.7379$ (95% CI 0.638–0.880) ($p<0.001$) by SPIES endoscopy, respectively. The agreement was confirmed as substantial and strong. Level of agreement of both endoscopic methods was 92.54%, kappa index $\kappa=0.8965$ (95% CI 0.877–0.954) ($p<0.001$), agreement was confirmed as almost perfect. Between NBI and SPIES endoscopic imaging methods is no significant differentiation.

Conclusion Both methods, NBI endoscopy and SPIES system, are comparable in detection and analysis of superficial neoangiogenesis, typical for benign lesion and for precancerous or cancerous changes in larynx and hypopharynx.

Keywords Precancerous lesion · Squamous cell carcinoma of larynx · Narrow band imaging · SPIES · Endoscopy

✉ Pavel Komínek
pavel.kominek@fno.cz

¹ Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, University Hospital Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava, Czech Republic

² Department of Craniofacial Surgery, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

Introduction

Precancerous and cancerous lesions of the larynx and hypopharynx manifest significant neoangiogenesis as epithelial and subepithelial microvascular changes that can be detected by image-enhanced-endoscopy, such as autofluorescence, contact endoscopy with vital tissue staining, and

more recently, narrow band imaging (NBI) [1] or the Storz Professional Image Enhancement system (SPIES) [2].

NBI (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) has a wide application in otorhinolaryngology (ENT) for preoperative and perioperative workup [3–5] and is effective for the follow-up of patients with ENT cancer after surgical treatment and/or chemoradiotherapy [6, 7].

SPIES (Karl Storz, Tuttlingen, Germany) is a new digital technique used to improve endoscopic visual–digital reprocessing, based on the spectral separation of the record within a high-definition camera system. SPIES enhances the appearance of the mucosal surface, and the epithelial vascular architecture is characterized by five defined spectral ranges (Clara, Chroma, Clara + Chroma, Spectra A, and Spectra B) [2, 8].

The main target of analysis in these techniques is neoangiogenesis, and observation of thick dark spots within a well-demarcated brownish area with proliferation of dilated and abnormal intraepithelial capillary loops (IPCLs) is generally considered a hallmark of epithelial precancerous or neoplastic evolution on NBI [9]. With SPIES, there also can be significant vascular network changes identified, especially in the Clara + Chroma and Spectra A–B modes [2].

Although NBI has been used for years and its impact is established in epithelial pathologies, experience with SPIES is more limited, with few publications comparing both methods. The aim of this study thus was to investigate and compare the image quality of NBI and SPIES modalities on prehistologic *in vivo* diagnosis of laryngeal and hypopharyngeal pathologies.

Materials and methods

The study was approved by the institutional ethics committee and performed in accordance with the Declaration of Helsinki, good clinical practice, and applicable regulatory requirements. Informed written consent was obtained from all participants or a legal representative before initiation of any procedure.

Between 8/2016 and 10/2017 in the Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery of University Hospital in Ostrava, 73 patients were examined at first by white light endoscopy or laryngoscopy for laryngeal or hypopharyngeal lesions (tumor, leukoplakia, recurrent respiratory papillomatosis (RRP), cyst, polyp, granuloma). All patients were symptomatic, especially they had hoarseness or other problems with voice. Recruited patients had either new, first-time evaluated lesion, or the previously diagnosed, chronic lesion (leukoplakia, RRP, granuloma), which was changed, enlarged and symptomatic. Patients with suspected lesions after radio- or chemoradiotherapy were excluded.

NBI and SPIES examination

Patients were investigated using a high-definition flexible endoscope with NBI endoscopy (Olympus Visera Elite system with an Olympus OTV-S190 camera head, Olympus ENF-VH 3.9 mm rhinolaryngovideoscope, and an OLYMPUS OEV-191H monitor; Olympus Medical System, Japan) under local anesthesia in an outpatient department. All patients also underwent direct laryngoscopy maximally 2–3 weeks after NBI endoscopy, and the microvascular patterns were evaluated using the Clara + Chroma and Spectra B modalities of the Storz Professional Image Enhancement System (IMAGE1 S™ camera platform with 30° rigid endoscope, Karl Storz, Tuttlingen, Germany), while ventilated via orotracheal intubation during the general anesthesia. Under endoscopic control, a target biopsy from the lesion was taken.

Evaluation of microvascular changes

Evaluation for neoangiogenesis was performed under NBI as well as SPIES endoscopy, and vascular patterns in the center and around the laryngeal or hypopharyngeal lesions were analyzed and classified according to descriptive guidelines of vascular changes by Arens et al. [10]. First, longitudinal (type I) and perpendicular vascular changes were characterized by three-dimensional perpendicular patterns, and the appearance of vascular loops was noted (types II–IV). In addition, every lesion was assigned to one of the four types of vascular patterns (Table 1). The vascular patterns alone would have been insufficient for discriminating pathological lesions, so the vascular network also was assessed in connection with the surface mucosal changes and epithelial abnormalities (exophytic or ulcerative lesion, smooth or rough surface, solitary or multiple lesion, laterality) that could clarify the endoscopic diagnosis. Extensions of microvascular changes detected in endoscopic images were noted, as were the limitations (mucus, irritation, bleeding, orotracheal tube) of the endoscopic imaging.

The NBI examination and SPIES endoscopy were performed by three experienced otolaryngologists, who described all microvascular changes without awareness of histology or diagnosis. Type of vascular architecture and the extent of microvascular patterns were compared between methods.

Histological examination

The lesions were evaluated by histological examination, and the cases were categorized into four groups, as follows: benign lesions, such as polyps, cysts, chronic

Table 1 Overview of vascular changes in the center or surrounding area of the laryngeal and hypopharyngeal lesions (according to Arens)

Type	Description of vascular pattern
I	Longitudinal vascular changes Enlarged and static vessels Meandering, tortuous, or dilated vessels Convoluted vessels Increased number of vessels or branches of vessels “Feeding” blood vessels
II	Perpendicular vascular changes Real vessel loops with a wide-angled turning point embedded in a three-dimensional warty structure
III	Enlarged and symmetric dot-like loops Abnormal IPCLs with narrow-angled turning points
IV	Abnormal worm-like vessels with spiral morphology and bizarre course

inflammation, and hyperkeratosis, and excluding RRP; RRP; low-grade dysplasia, i.e., mild and moderate dysplasia; and severe dysplasia, carcinoma in situ, or invasive squamous cell carcinoma. Results were compared with NBI and SPIES optical biopsy findings (Table 2).

Statistical analyses

The kappa index (κ) was used to evaluate the agreement of NBI or SPIES results with histopathology findings and agreement between endoscopic methods. The sensitivity and specificity were independently analyzed and reported with 95% confidence intervals (CIs). A p value of < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using the Stata statistical package (version 13; Stata Press Publication, Texas, 2013).

Results

Seventy-three patients with lesions of the larynx and hypopharynx were enrolled. Of this group, 50 (68.5%) were male and 23 (31.5%) were female, and their average age was 51.2 years (range 5–81 years).

Correlation between histology and NBI or SPIES optical biopsy findings

Benign lesions were histologically confirmed in 26/73 (35.6%) of cases. Longitudinal vascular patterns (type I) in high-definition endoscopic images typical for benign lesions were detected in 20/26 (76.9%) lesions using NBI endoscopy and in 20/26 (76.9%) using SPIES endoscopy. Vascular changes of type III were detected in 5/26 (19.2%) cases by NBI and in 4/26 (15.4%) by SPIES, respectively (Fig. 1). With SPIES endoscopy, 1 of 26 lesions (3.8%) was identified as type IV IPCL. With both endoscopic methods, the vascular network was invisible in 1 (3.8%) case.

Table 2 Evaluation of lesions by NBI and SPIES endoscopy and comparison of endoscopic imaging with histopathologic readings

Type of vascular changes	Histological findings ($N = 73$)							
	Benign 26/73		Recurrent respiratory papillomatosis 16/73		Low-grade dysplasia 7/73		High-grade dysplasia/carcinoma in situ/invasive squamous cell carcinoma 24/73	
	NBI	SPIES	NBI	SPIES	NBI	SPIES	NBI	SPIES
I	20/26 (76.9%)	20/26 (76.9%)	0	0	3/7 (42.9%)	4/7 (57.1%)	1/24 (4.2%)	0
II	0	0	15/16 (93.8%)	16/16 (100%)	0	0	0	0
III	5/26 (19.2%)	4/26 (15.4%)	0	0	3/7 (42.9%)	2/7 (28.6%)	3/24 (12.5%)	3/24 (12.5%)
IV	0	1/26 (3.8%)	0	0	1/7 (14.3%)	1/7 (14.3%)	19/24 (79.2%)	18/24 (75.0%)
Impossible to evaluate	1/26 (3.8%)	1/26 (3.8%)	1/16 (6.2%)	0	0	0	1/24 (4.2%)	3/24 (12.5%)

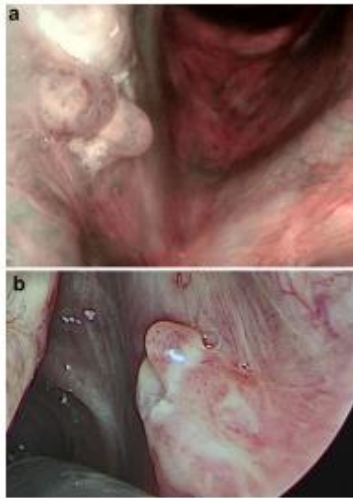


Fig. 1 Comparison of imaging of a tumor on the posterior third of the right vocal cord by NBI endoscopy (a) and SPIES endoscopy (b Spectra B mode). A perpendicular type III IPCL was recorded by both endoscopy methods on the surface of the tumor, and low-grade dysplasia was detected by histological examination

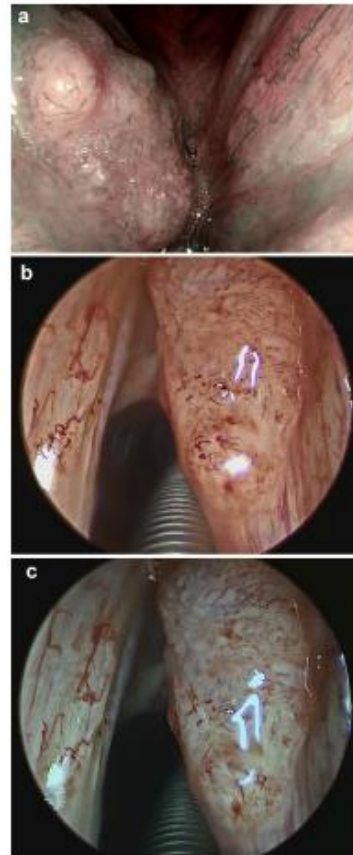


Fig. 2 Comparison of imaging of the tumor on the right vocal cord by NBI endoscopy (a) and SPIES endoscopy (b Clara+Chroma mode; c Spectra B mode). A pathological perpendicular type VI IPCL on the vocal cord was recorded by both endoscopy methods, and squamous cell carcinoma was confirmed by histological examination

RRP was confirmed in 16/73 (21.9%) cases by histological examination. Perpendicular microvascular changes characteristic of RRP (type II) were imaged in 15/16 (93.8%) cases by NBI and in 16/16 (100.0%) by SPIES. In 1 of the 16 cases (6.2%), NBI evaluation was not possible because of irritation.

Low-grade dysplasia was detected by histological examination in 7/73 (9.6%) cases and accurately identified by NBI in 6/7 (85.7%) lesions: vascular type I in 3/7 (42.9%) and type III in 3/7 (42.9%) cases. With SPIES endoscopy, 6/7 (85.7%) lesions were recognized: vascular type I in 4/7 (57.1%) and type III in 2/7 (28.6%).

Histological features of severe dysplasia, carcinoma in situ, or invasive squamous cell carcinoma were detected in 24/73 (32.9%) patients. NBI identified neoplastic neoangiogenesis (type IV) in 19/24 (79.2%) and SPIES in 18/24 (75.0%) cases (Fig. 2). In 3/24 (12.5%), lesions were described by NBI as vascular type III, 1/24 (4.2%) as vascular type I, and 1/24 (4.2%) as unclear. In 3/24 (12.5%), lesions were assessed by SPIES as vascular type III. Epithelial vascular changes were not assessable by SPIES endoscopy in 3/24 (12.5%) cases because of tumor bleeding or endotracheal tube position during general anesthesia.

Statistical analysis

Results of NBI/SPIES endoscopy and histopathological features of laryngeal and hypopharyngeal lesions were compared. The level of agreement between NBI and histological assessment was 81.43% ($\kappa=0.7428$; 95% CI 0.682–0.832; $p<0.001$); for SPIES and histological assessment, the agreement was 81.16% ($\kappa=0.7379$; 95% CI 0.638–0.880; $p<0.001$). The agreement in both cases was confirmed as substantial and strong. The level of agreement between the endoscopic methods was 92.54% ($\kappa=0.8965$; 95% CI 0.877–0.954; $p<0.001$), which was

near perfect. The two endoscopic imaging methods did not differ significantly from each other.

In the differentiation of non-malignant lesions (cyst, polyp, inflammation, hyperkeratosis, mild/moderate dysplasia) from malignant lesions (severe dysplasia, carcinoma in situ, invasive squamous cell carcinoma), the sensitivity and specificity of NBI endoscopy in prediction of histological diagnosis in white light detected lesions were 83.0% (95% CI 60–94) and 98.0% (95% CI 87–100), respectively; for SPIES, these values were 86.0% (95% CI 63–96) and 96.0% (95% CI 87–99), respectively. The positive and negative predictive values for NBI were 95 and 92%, respectively; for SPIES endoscopy, they were 90 and 94%.

A greater lesion extent and new lesions not visible in white light were detected in 16/73 (21.9%) cases with NBI endoscopy and in 15/73 (20.5%) cases with SPIES, respectively. The same demarcation of vascular changes with both endoscopic approaches was confirmed in 42/73 (57.5%) patients, with no significant difference.

Discussion

In recent decades, laryngeal and hypopharyngeal endoscopic methods and tools have improved, leading to earlier detection of not only epithelial, but also vascular changes [10–13]. A differentiated and structured assessment of superficial vascular patterns is important for developing a clear prognostic statement for benign and malignant laryngeal/hypopharyngeal diseases as well as for planning therapeutic strategies. In addition to normal white light endoscopy, among many other “biologic endoscopy” tools (e.g., autofluorescence, contact endoscopy with vital tissue staining, confocal endomicroscopy), NBI is increasingly preferred and recommended [14]. Although NBI endoscopy has been commonly used in the last decade, the first experiences with SPIES for assessment neoangiogenesis in ENT were published recently [2].

An integrated classification of epithelial microvascular changes in endoscopic imaging is not available, precluding a straightforward comparison NBI and SPIES. The first used classification described only the character of changes in capillary loop patterns in laryngeal tumors with NBI endoscopy [15]. This classification primarily applied a rigid schedule of such vascular changes correlated with their histopathologic nature and seemed insufficient for achieving the best possible results or improving the potential of endoscopic “pre-histologic diagnosis.” Nevertheless, these authors reported a diagnostic accuracy of 90.4% (sensitivity, specificity, and positive predictive value were, respectively, 88.9, 93.2, and 90.9%) in detecting malignant lesions from carcinoma in situ to invasive carcinoma.

Arens et al. divided superficial vascular architecture in a quite simplistic and practical approach, through a

dichotomous distinction between benign (longitudinal vessels) and premalignant or malignant (perpendicular vessels) lesions [10]. This descriptive classification of vascular changes was created especially for vocal folds, but we used it in our study for evaluation of all laryngeal and hypopharyngeal lesions on NBI and SPIES endoscopy, in particular because of the lack of an accurate classification for vascular patterns on SPIES imaging.

For longitudinal vascular changes, the typical measures are the two dimensions of length and width. Detecting this type of vessel on NBI endoscopy is not difficult because the vascular network is localized very often on the smooth surface of the pathological lesion. In our study, benign lesions or low-grade dysplasia were confirmed in 23/24 (95.8%) lesions with longitudinal vessels by NBI, respectively in 24/24 (100.0%) cases with SPIES imaging.

Perpendicular vascular networks are characterized by the development of IPCLs. Analysis of IPCLs could be useful for differentiating the spectrum of laryngeal epithelium changes toward malignancy. The main problems have been noted in the evaluation of the narrow-angled turning loop under the still translucent epithelium arising from deeper layers of the larynx or hypopharynx, where the IPCLs can be recognized as small symmetric dots [10, 15]. These features could be characteristic of benign lesions or low-grade dysplasia, typical for hyperkeratosis or mild or moderate dysplasia [15], but sometimes, this appearance could imitate vascular changes of HPV-related RRP [10, 16].

With RRP, the capillary loops can be confirmed as the typical three-dimensional warty structure by means of endoscopy. They represent the vascular loop below the epithelium, which rises from the deeper layers of the mucosal membrane. Unlike precancerous lesions, these capillary loops are symmetrical and point-like. In addition to changes in the vessels, however, the surrounding tissue also is changed by the epithelial stimulus. Typical warty changes develop with RRP. These features, like the central capillary loop in each morula-like bulge, generally help to differentiate the papilloma from more severe dysplasia or a squamous cell carcinoma [17].

In our analysis, the typical three-dimensional appearance with symmetrical capillary loops generally with clear epithelial surface was considered RRP, and this “optical” biopsy was histologically confirmed in all cases. The same results were detected with both endoscopic methods. One pediatric patient was not clearly examined by NBI endoscopy under local anesthesia because of crying and moving during assessment.

Enlarged, bifurcated, and relatively symmetrical dot-like loops or dark brown spots were the main problems in the evaluation. In the first and most extended classification of laryngeal vascular patterns in NBI endoscopy, Ni et al. described this appearance of vascular changes as benign

because low-grade dysplasia was more frequently observed in those lesions [15]. Arens et al. declared that in the carcinogenic process, the vascular loops become increasingly spiral [10, 12]. Emiliani et al. [8] noted an impact of the Clara + Chroma modality for detecting dark spots on SPIES endoscopy because of increased brightness and color contrast. We detected dot-like loops mostly on the smooth surface of laryngeal or hypopharyngeal lesions, in some cases in the surroundings of the granuloma or leukoplakia. Laryngeal leukoplakia is considered a precancerous lesion with quite variable macroscopic appearance under white-light endoscopy. NBI endoscopy significantly improves detection of malignant potential of leukoplakia during optical biopsy [18]. Dot-like loops correlated with mild or moderate dysplasia in 8/11 (72.7%) of NBI findings and in 6/9 (66.7%) cases of SPIES endoscopy, respectively. High-grade dysplasia or squamous cell carcinoma was confirmed histologically in the remaining lesions with detection of dot-like IPCLs on the rough surface and in one case, in the ulcerative lesion.

The growth of epithelial tumors leads to escalated disorderliness of vascular microarchitecture, which is observed in practice as changes in the IPCL arrangement, diameter, and shape and as a loss of regularity [10]. Collapse of the microvascular architecture can be frequently observed, and the abnormal dot-like vascular changes occur typically in the periphery of the exophytic as well as ulcerative areas of the tumor [10, 16]. On the background of those macroscopic features, irregular IPCLs with spiral morphology and a bizarre course and high-grade dysplasia or squamous cell carcinoma were confirmed by pathologists in 19/20 (95.0%) cases detected by NBI and 18/20 (90.0%) cases on SPIES endoscopy, especially with the Spectra A–B modality. Spectra A and B use different color filter settings that allow for better contrast between tissues. Emiliani et al. reported that the image quality of Spectra A and B has a worse score compared to white light because digital postprocessing manipulation may decrease image quality [8]. In our study, however, the accuracy rate using Spectra A and B was similar to that with NBI. Regardless, visualization of the vascular network was most difficult in those lesions. Using NBI endoscopy with local anesthesia, the lesions were very often covered hyperkeratosis or mucus; on the other hand, during SPIES endoscopy with general anesthesia, all patients were intubated, and brittle tissue was mostly damaged and bled. This last factor limited correct analysis of vascular changes characteristic for squamous cell carcinoma by NBI endoscopy in one case and by SPIES endoscopy in three.

The aim of our study was to compare outcomes of two different endoscopic systems in “optical biopsy.” This paper does not evaluate NBI or SPIES as a screening tool, but emphasizes the impact of endoscopic methods for clinical examination. Both methods seem to be effective and with approximately similar accuracy to histological results,

especially in recognition of benign lesions, including RRP or low-grade dysplasia. Detection of vascular IPCLs typical for benign laryngeal or hypopharyngeal pathologies mostly on the smooth epithelium was often easier than analysis of IPCLs on a rough and irregular tumor surface. In both endoscopic imaging modalities, the evaluation of dot-like loops presented the main problem of interpretation of prehistological diagnosis. Next steps should involve a focus on this type of vascular change in the context of the laryngeal and hypopharyngeal surface.

For examination by NBI or SPIES system, it is necessary to use endoscopic tower, camera head and flexible or rigid endoscope. The price of this equipment is quite similar in both systems; however, it could be different in each country. The costs of NBI and SPIES technology are also comparable.

Conclusion

Both the NBI videoendoscopy and SPIES endoscopy methods are comparable in detection and analysis of superficial neoangiogenesis that is typical for benign lesions and also for precancerous or cancerous changes.

Acknowledgements The authors would like to thank MSc. Ing. Hana Tomášková, Ph.D., from the Institute of Epidemiology and Public Health, Medical Faculty of the Ostrava University, Czech Republic, for help with statistical analysis.

Funding This paper was supported by the Ministry of Health, Czech Republic, Conceptual Development of Research Organization, MH CZ-DRO-FNOs/2017.

Compliance with ethical standards

Research involving human participants and/or animals All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Conflict of interest The authors declare that there is no actual or potential conflict of interest in relation to this article. No benefits in any form have been received or will be received from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this article.

References

1. Piazza C, Dessouky O, Peretti G, Cocco D, De Benedetto L, Nicolai P (2008) Narrow-band imaging: a new tool for evaluation of head and neck squamous cell carcinomas. Review of the literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 28:49–54



2. Puxeddu R, Sionis S, Gerosa C, Carta F (2015) Enhanced contact endoscopy for the detection of neoangiogenesis in tumors of larynx and hypopharynx. *Laryngoscope* 125:1600–1606
3. Piazza C, Cocco D, De Benedetto L, Del Bon F, Nicolai P, Peretti G (2010) Narrow band imaging and high definition television in the assessment of laryngeal cancer: a prospective study on 279 patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 267(3):409–414
4. Watanabe A, Taniguchi M, Tsujie H, Hosokawa M, Fujita M, Sasaki S (2009) The value of narrow band imaging for early detection of laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266(7):1017–1023
5. Staníková L, Kučová H, Walderová R, Zeleník K, Šatanková J, Komínek P (2015) Value of narrow band imaging (NBI) in early diagnosis of laryngeal cancer. *Klin Onkol* 28(2):116–120
6. Zábrodský M, Lukeš P, Lukešová E, Bouček J, Plzák J (2014) The role of narrow band imaging in the detection of recurrent laryngeal and hypopharyngeal cancer after curative radiotherapy. *Biomed Res Int*. <https://doi.org/10.1155/2014/175398> (article ID 175398, Epub 30 Jun 2014)
7. Piazza C, Cocco D, De Benedetto L, Del Bon F, Nicolai P, Peretti G (2010) Role of narrow-band imaging and high-definition television in the surveillance of head and neck squamous cell cancer after chemo- and/or radiotherapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 267(9):1423–1428
8. Emiliani E, Talso M, Baghdadi M, Barreiro A, Orosa A, Servian P, Gavrilo P, Proietti S, Traxer O (2017) Evaluation of the Spies™ modalities image quality. *Int Braz J Urol* 43:476–480
9. Lin YC, Wang WH, Lee KF (2012) Value of narrow band imaging endoscopy in early mucosal head and neck cancer. *Head Neck* 34(11):1574–1579
10. Arens C, Piazza C, Andrea M, Dikkers FG, Tjon Pian Gi REA, Voigt-Zimmermann Z, Peretti G (2016) Proposal for a descriptive guideline of vascular changes in lesions of the vocal folds by the committee on endoscopic laryngeal imaging of the European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 273(5):1207–1214
11. Voigt-Zimmermann S, Arens C (2014) Vascular lesions of vocal folds—part 1: horizontal vascular lesions. *Laryngo Rhino Otol* 93(1):1–12
12. Arens C, Glanz H, Voigt-Zimmermann S (2015) Vascular lesions of vocal folds—part 2: vertical vascular lesions. *Laryngo Rhino Otol* 94(11):738–744
13. Stevens SM, Johnson EA, Pfau PR, Dailey SH (2015) Visual evaluation of the larynx and hypopharynx during esophagogastroduodenoscopy: a safety and feasibility study. *Surg Endosc* 29:1209–1215
14. Piazza C, Del Bon F, Peretti G, Nicolai P (2012) Narrow band imaging in endoscopic evaluation of the larynx. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 20(6):472–476
15. Ni XG, He S, Xu ZG, Gao L, Lu N, Yuan Z, Lai SQ, Zhang JM, Yi JL, Wang WL, Zhang L, Li XY, Wang GQ (2011) Endoscopic diagnosis of laryngeal cancer and precancerous lesions by narrow band imaging. *J Laryngol Otol* 125(3):288–296
16. Lukeš P, Zábrodský M, Lukešová E, Chovanec M, Astl J, Betka J, Plzák J (2014) The role of NBI HDTV magnifying endoscopy in the prehistologic diagnosis of laryngeal papillomatosis and spinocellular cancer. *Biomed Res Int*. <https://doi.org/10.1155/2014/285486> (article ID 285486, Epub 17 Jun 2014)
17. Arens C, Betz C, Kraft M, Voigt-Zimmermann S (2017) Narrow band imaging for early diagnosis of epithelial dysplasia and microinvasive tumors in the upper aerodigestive tract. *HNO* 65(Suppl 1):S5–S12. <https://doi.org/10.1007/s00106-016-0284-x>
18. Staníková L, Šatanková J, Kučová H, Walderová R, Zeleník K, Komínek P (2017) The role of narrow-band imaging (NBI) endoscopy in optical biopsy of vocal cord leukoplakia. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 274(1):355–359. <https://doi.org/10.1007/s00405-016-4244-6> (Epub 2016 Aug 11)

Příloha 7: STANIKOVA, Lucia, Martin FORMANEK, Pavel HURNIK, Peter KANTOR, Pavel KOMINEK a Karol ZELENIK. Diagnosis of Laryngeal Pemphigus Vulgaris Can Be Facilitated Using Advanced Endoscopic Methods. *Medicina-Lithuania* [online]. 2021, 57(7), 686. ISSN 1010-660X. Dostupné z: doi:10.3390/medicina57070686. (IF 2020 = 2,430; Q2)



Communication

Diagnosis of Laryngeal Pemphigus Vulgaris Can Be Facilitated Using Advanced Endoscopic Methods

Lucia Staníková¹, Martin Formánek^{1,2} , Pavel Hurník³, Peter Kántor^{1,2} , Pavel Komínek^{1,2} and Karol Zeleník^{1,2,*} 

- ¹ Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, University Hospital Ostrava, 17. Listopadu 1790, 70800 Ostrava, Czech Republic; lucia.stanikova@fno.cz (L.S.); martin.formanek@fno.cz (M.F.); peter.kantor@fno.cz (P.K.); pavel.kominek@fno.cz (P.K.)
 - ² Department of Craniofacial Surgery, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Syllabova 19, 70300 Ostrava, Czech Republic
 - ³ Department of Pathology, University Hospital Ostrava, 17. listopadu 1790, 70800 Ostrava, Czech Republic; pavel.hurnik@fno.cz
- * Correspondence: karol.zelenik@fno.cz

Abstract: *Background:* Isolated laryngeal pemphigus vulgaris (LPV) is rare; however, early diagnosis is crucial in determining its course and prognosis. This paper aims to describe mucosal vascular changes typical for LPV using advanced endoscopic methods, which include Narrow Band Imaging (NBI), IMAGE1-S video-endoscopy and enhanced contact endoscopy (ECE). *Materials and Methods:* Retrospective analysis of all laryngeal mucosal lesion examined using advanced endoscopic methods during 2018–2020 at tertiary hospital was performed. *Results:* Videolaryngoscopy examination records of 278 patients with laryngeal mucosal lesions were analyzed; three of them were diagnosed with LPV. Epithelial vascularization of LPV included specific pattern. Intraepithelial papillary capillary loops were symmetrically stratified and were organized into “contour-like lines”. This specific vascularization associated with LPV were different from other laryngeal mucosal pathologies. *Conclusions:* Using advanced endoscopic methods supports early diagnosis of LPV and accelerate the diagnosis and treatment.

Keywords: pemphigus vulgaris; larynx; Narrow Band Imaging (NBI); IMAGE1-S; enhanced contact endoscopy (ECE)



Citation: Staníková, L.; Formánek, M.; Hurník, P.; Kántor, P.; Komínek, P.; Zeleník, K. Diagnosis of Laryngeal Pemphigus Vulgaris Can Be Facilitated Using Advanced Endoscopic Methods. *Medicina* 2021, 57, 686. <https://doi.org/10.3390/medicina57070686>

Academic Editors: Sylvia Hsu and Kiran Motaparthy

Received: 17 June 2021
Accepted: 4 July 2021
Published: 6 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pemphigus comprises a group of autoimmune blistering diseases with skin and mucosal manifestations. Pemphigus vulgaris (PV) is a mucocutaneous disease that presents as enanthemas and erosions, typically in the oral cavity. Other mucosal surfaces are less frequently involved [1]. Exfoliating blisters are painful, can bleed, and in severe cases, they can lead to rapid weight loss. Pemphigus may have an idiopathic origin, or in some cases may be a drug-induced reaction [2]. Rarely, particularly in patients with lymphoproliferative disorders (mostly non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia), PV is considered a paraneoplastic manifestation [1].

PV with primary laryngeal involvement and without other mucosal or skin lesions is extremely rare; to date, only a very limited number of case series and case reports have been published on this manifestation [3–8]. Laryngeal mucosal lesions, like leukoplakia and erythroplakia, typically arouse suspicion of a precancerous or cancerous lesion. Laryngeal pemphigus vulgaris (LPV) is not typically considered first in a differential diagnosis, although early diagnosis and treatment affect its course and prognosis.

It has been acknowledged that advanced endoscopy methods, like narrow band imaging (NBI), IMAGE1-S™ video-endoscopy and enhanced contact endoscopy (ECE), can facilitate the pre-histological diagnosis of mucosal lesions [9–18]. However, to date, no

study has described a vascular pattern typical of LPV. Therefore, this short communication aimed to describe the vascular pattern typical of LPV and discuss differences from other laryngeal pathologies.

2. Materials and Methods

Retrospective analysis of all flexible videolaryngoscopy examination records performed with aim to evaluate laryngeal mucosal lesions during 2018 to 2020 period was performed. After flexible videolaryngoscopy, all patients underwent microlaryngoscopy with excision of mucosal lesion and its histopathology examinations. Patients with diagnosed LPV were selected and their videolaryngoscopy examination records (including advanced endoscopy methods) were compared with other findings to determine if vascular pattern of LPV differs or not.

3. Results

Videolaryngoscopy examination records of 278 patients with laryngeal mucosal lesions were analyzed; 3 of them were diagnosed with LPV (Figure 1).

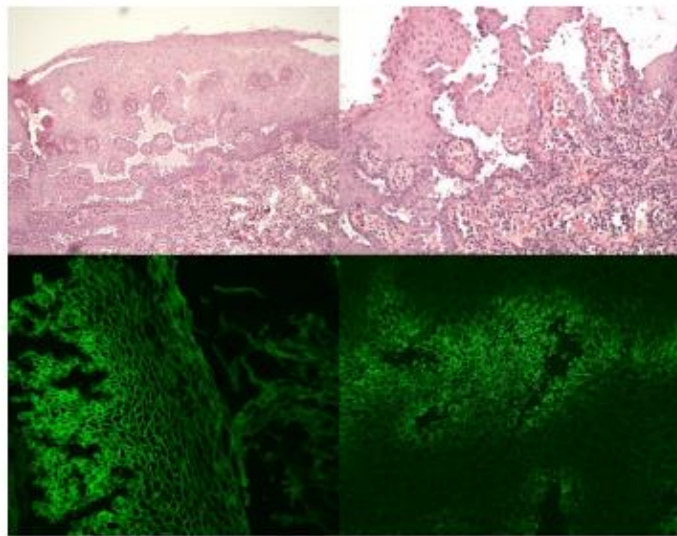


Figure 1. Histopathology and direct immunofluorescence of laryngeal pemphigus vulgaris specimens. Upper left—suprabasilar acantholytic blister with intraepithelial suprabasilar clefting; HE stain, 100× magnification. Upper right—suprabasilar acantholysis and plasma cell infiltrate among villous-like projections of lamina propria, covered by a few layers of epithelium; HE stain, 200× magnification. Lower left—intercellular linear deposition of IgG in direct immunofluorescence, DIF IgG, 200× magnification. Lower right—intercellular granular deposition of C3 in direct immunofluorescence, DIF C3, 200× magnification.

Epithelial vascularization of mucosal lesions in patients with LPV included specific pattern. LPV manifested as flat lesions that rise slightly above the mucosal surface. The surface of LPV lesions was partly coated with different thicknesses of leukoplakia. In areas of little or no leukoplakia, intraepithelial papillary capillary loops (IPCLs), symmetrically stratified and organized into contour-like lines, were observed with advanced endoscopic imaging (NBI, IMAGE1-S). IPCLs were very thin and short, and they ran towards the surface. They appeared as small brown spots, symmetrically distributed, aligned in regular rows and without clear boundaries. The overall picture resembles a “contour line map”

(Figures 2–4). This appearance is very specific and was not observed in other laryngeal pathologies (laryngeal cancer, dysplastic changes, papillomatosis, polyps etc.) in our group of patients. Enhanced contact endoscopy (ECE) revealed these changes even more precisely (Figure 5).



Figure 2. Patient 1, epiglottis. Typical endoscopic picture of laryngeal pemphigus vulgaris during laryngoscopy using IMAGE1-S, Clara + Chroma video-endoscopy. The overall picture resembles a "contour line map".

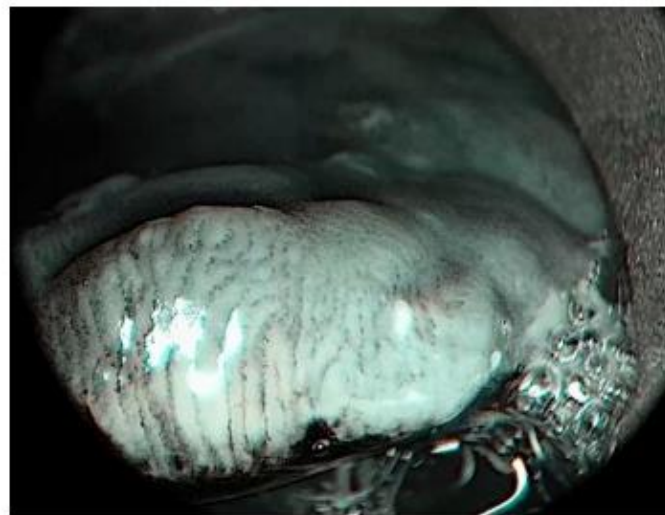


Figure 3. Patient 2, epiglottis. Epiglottis affected by laryngeal pemphigus vulgaris, imaged with IMAGE1-S, SPECTRA A mode. Intraepithelial papillary capillary loops (IPCLs) organized into contour lines are more accentuated with SPECTRA A modality.

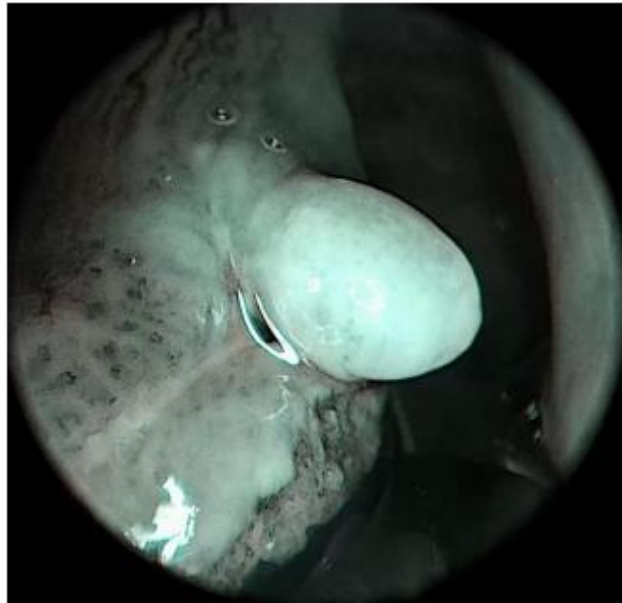


Figure 4. Patient 3, left vocal cord, posterior part. Laryngeal pemphigus vulgaris manifested as exophytic lesion covered with leukoplakia. Posteriorly to the exophytic lesion typical “contour line map” picture imaged with IMAGE1-S, SPECTRA A mode is present.

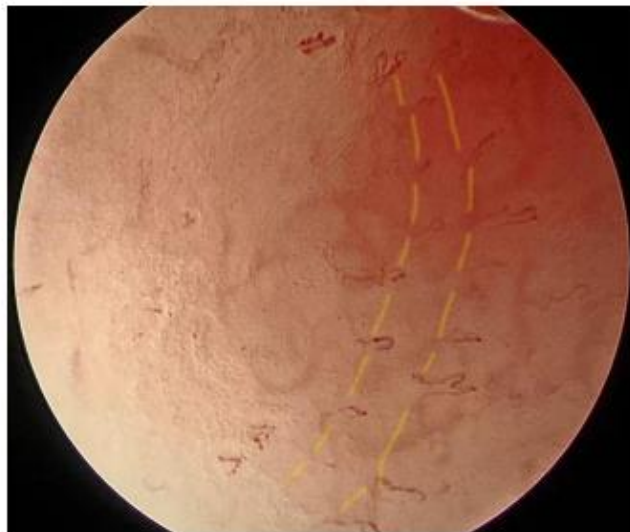


Figure 5. Epiglottis of patient 2 with laryngeal PV imaged with enhanced contact endoscopy (ECE), Clara + Chroma mode, 60× magnification. Very thin, short IPCLs are visible; they arise from the underlying vasculature and run toward the surface; they are symmetrically distributed and strictly stratified into regular rows (marked with yellow lines).

4. Discussion

Laryngeal mucosal lesions have broad differential diagnosis; it extends from chronic laryngitis, on one end, to invasive cancer, on the other end. Because LPV is rare, typical signs that can distinguish LPV from other pathologies might be overlooked. However, modern advanced endoscopic methods enable more precise visualization of vascular changes and can be used in “prehistological diagnostics”. Our observations suggest that the mucosal changes visible using advanced endoscopic methods and described above as a “contour line map” are quite indicative of LPV.

Main differential diagnosis of LPV include highly dysplastic lesions, laryngeal cancer, and papillomatosis. Indeed, the signs of malignant transformation in epithelial capillaries include irregular IPCL arrangements, asymmetric capillary courses, and increasing numbers and diameters of branching vessels [12,13,19–21]. The papilloma vascularization is typically characterized by irregular shapes and calibers, and IPCLs that course with regular exophytic papillae with central vessels [11]. However, these features are not present in PV lesions.

LPV vascularization resembles the benign, more than the malignant type of vascularization. PV vascularization best corresponds to Type III of the new Ni classification system [18]. The only sign that might lead us to consider malignancy is the presence of perpendicular vessels. However, the type of vessels and the typical “contour line map” pattern should indicate a diagnosis of LPV.

Using of advanced endoscopic methods (NBI, IMAGE1-S, ECE) to assess mucosal lesions is analogy to using modern dermoscopy and capillaroscopy techniques to assess tumorous, inflammatory, and rheumatological skin pathologies [22,23].

From the clinical point of view, it is important to mention that LPV lesions localized in the larynx can cause deterioration of airway patency [24]. Therefore, LPV should be included in the differential diagnosis in case of upper respiratory obstruction.

This report has certain shortcomings. Because no one patient from our group was diagnosed with pemphigoid, we could not provide differential diagnosis of LPV and pemphigoid. Moreover, we could not identify any report about vascular pater of pemphigoid described using advanced endoscopic methods in the current literature. Moreover, future studies are needed to explore this topic. Because LPV is a rare disease, multi-institutional cooperation is necessary to obtain more robust data on the subject.

5. Conclusions

Advanced endoscopic methods can facilitate distinguishing LPV from other, more common entities that occur in the larynx, particularly cancerous lesions. LPV can be identified by a typical “contour line map” pattern. Suspicion of LPV can accelerate the diagnostic process and treatment.

Author Contributions: Conceptualization, L.S., K.Z., and P.K. (Pavel Komínek) methodology, L.S., M.F., and P.K. (Peter Kántor); formal analysis, P.K. (Pavel Komínek), P.H., and L.S.; writing—original draft preparation, L.S. and M.F.; writing—review and editing, K.Z., funding acquisition, P.K. (Peter Kántor). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Supported by MH CZ—DRO—FNOs/2020.

Institutional Review Board Statement: The retrospective study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of University Hospital Ostrava (protocol code—135/2021, date of approval—25 March 2021).

Informed Consent Statement: Patient consent was waived due to retrospective nature of the study and using unidentifiable pictures.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Schmidt, E.; Kasperkiewicz, M.; Joly, P. Pemphigus. *Lancet* **2019**, *394*, 882–894. [\[CrossRef\]](#)
- Palleria, C.; Bennardo, L.; Dastoli, S.; Iannone, L.F.; Silvestri, M.; Manti, A.; Nisticò, S.P.; Russo, E.; De Sarro, G. Angiotensin-converting-enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers induced pemphigus: A case series and literature review. *Dermatol. Ther.* **2019**, *32*, e12748. [\[CrossRef\]](#)
- Kavala, M.; Altıntaş, S.; Kocaturk, E.; Zindanci, İ.; Can, B.; Ruhi, Ç.; Turkoglu, Z. Ear, nose and throat involvement in patients with pemphigus vulgaris: Correlation with severity, phenotype and disease activity. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2011**, *25*, 1324–1327. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- España, A.; Fernández, S.; Del Olmo, J.; Marquina, M.; Pretel, M.; Ruba, D.; Sánchez-Ibarrola, A. Ear, nose and throat manifestations in pemphigus vulgaris. *Br. J. Dermatol.* **2007**, *156*, 733–737. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Vasiliou, A.; Nikolopoulos, T.P.; Manolopoulos, L.; Yiotakis, J. Laryngeal pemphigus without skin manifestations and review of the literature. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **2006**, *264*, 509–512. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hale, E.K.; Bystyn, J.C. Laryngeal and nasal involvement in pemphigus vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2001**, *44*, 609–611. [\[CrossRef\]](#)
- Wallner, L.J.; Alexander, R.W. Pemphigus of the larynx. *Laryngoscope* **1964**, *74*, 575–586. [\[CrossRef\]](#)
- Obregon, G. Pemphigus of the larynx. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **1957**, *66*, 649–655. [\[CrossRef\]](#)
- Ni, X.-G.; He, S.; Xu, Z.-G.; Gao, L.; Lu, N.; Yuan, Z.; Lai, S.-Q.; Zhang, Y.-M.; Yi, J.-L.; Wang, X.-L.; et al. Endoscopic diagnosis of laryngeal cancer and precancerous lesions by narrow band imaging. *J. Laryngol. Otol.* **2010**, *125*, 288–296. [\[CrossRef\]](#)
- Rzepakowska, A.; Sielska-Badurek, E.; Żurek, M.; Osuch-Wójcikiewicz, E.; Niemczyk, K. Narrow band imaging for risk stratification of glottic cancer within leukoplakia. *Head Neck* **2018**, *40*, 2149–2154. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Staníková, L.; Walderová, R.; Jančatová, D.; Formanek, M.; Zeleník, K.; Komínek, P. Comparison of narrow band imaging and the Storz Professional Image Enhancement System for detection of laryngeal and hypopharyngeal pathologies. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* **2018**, *275*, 1819–1825. [\[CrossRef\]](#)
- Lukeš, P.; Zabrodsky, M.; Lukesova, E.; Chovanec, M.; Astl, J.; Betka, J.A.; Plizák, J. The Role of NBI HDTV Magnifying Endoscopy in the Prehistologic Diagnosis of Laryngeal Papillomatosis and Spinocellular Cancer. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Puxeddu, R.; Sionis, S.; Gerosa, C.; Carta, F. Enhanced contact endoscopy for the detection of neoangiogenesis in tumors of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope* **2015**, *125*, 1600–1606. [\[CrossRef\]](#)
- Shofel-Havakuk, H.; Lahav, Y.; Meidan, B.; Haimovich, Y.; Warman, M.; Haiin, M.; Hamzany, Y.; Brodsky, A.; Landau-Zemer, T.; Halperin, D. Does narrow band imaging improve preoperative detection of glottic malignancy? A matched comparison study. *Laryngoscope* **2017**, *127*, 894–899. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ohki, M.; Kikuchi, S.; Ohata, A.; Sugiki, T.; Kitano, Y.; Yamada, M. Oral, Pharyngeal and Laryngeal Lesions in Mucous Membrane Pemphigoid and Usefulness of Narrow Band Imaging. *Otolaryngol. Res. Rev.* **2017**, *1*, 4–8.
- Di Pietro, M.; Palleschi, G.M.; Barzacchi, M.; Locatello, L.G.; Ninu, M.B. A case of laryngeal mucous membrane pemphigoid possibly triggered by radiotherapy. *Indian J. Dermatol.* **2020**, *65*, 546–547. [\[CrossRef\]](#)
- Staníková, L.; Šatanková, J.; Kučová, H.; Walderová, R.; Zeleník, K.; Komínek, P. The role of narrow-band imaging (NBI) endoscopy in optical biopsy of vocal cord leukoplakia. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* **2017**, *274*, 355–359. [\[CrossRef\]](#)
- Klimza, H.; Jackowska, J.; Tokarski, M.; Piersiala, K.; Wierzbicka, M. Narrow band imaging (NBI) for improving the assessment of vocal fold leukoplakia and overcoming the umbrella effect. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0180590. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ni, X.; Zhu, J.-Q.; Zhang, Q.-Q.; Zhang, B.-G.; Wang, G.-Q. Diagnosis of vocal cord leukoplakia: The role of a novel narrow band imaging endoscopic classification. *Laryngoscope* **2019**, *129*, 429–434. [\[CrossRef\]](#)
- Arens, C.; Piazza, C.; Andrea, M.; Dikkers, F.G.; Tjon Pian Gi, R.E.A.; Voigt-Zimmermann, Z.; Peretti, G. Proposal for a descriptive guideline of vascular changes in lesions of the vocal folds by the committee on endoscopic laryngeal imaging of the European Laryngological Society. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **2016**, *73*, 1207–1214. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mehlum, C.S.; Rosenberg, T.; Dyrvig, A.-K.; Groentved, A.M.; Kjaergaard, T.; Godballe, C. Can the Ni classification of vessels predict neoplasia? A systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope* **2018**, *128*, 168–176. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sgouros, D.; Apalla, Z.; Ioannides, D.; Katoulis, A.; Rigopoulos, D.; Sotiriou, E.; Stratigos, A.; Vakirlis, E.; Lallas, A. Dermoscopy of Common Inflammatory Disorders. *Dermatol. Clin.* **2018**, *36*, 359–368. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ingegnoli, F.; Smith, V.; Sulli, A.; Cutolo, M.; Francesca, I.; Vanessa, S.; Alberto, S.; Maurizio, C. Capillaroscopy in Routine Diagnostics: Potentials and Limitations. *Curr. Rheumatol. Rev.* **2018**, *14*, 5–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gregoriou, S.; Koutsoukou, X.A.; Panayotides, I.; Theodoropoulos, K.; Loumou, P.; Prikas, K.; Katoulis, A.; Rigopoulos, D. Pemphigus vulgaris of the epiglottis successfully treated with rituximab. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2015**, *29*, 1845–1846. [\[CrossRef\]](#)

Příloha 8: STANIKOVA, Lucia, Karol ZELENIK, Martin FORMANEK, Jana SEKO, Radana WALDEROVA, Peter KANTOR a Pavel KOMINEK. Evolution of voice after transoral laser cordectomy for precancerous lesions and early glottic cancer. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* [online]. 2021, 278(8), 2899–2906. ISSN 0937-4477. Dostupné z: doi:10.1007/s00405-021-06751-3. (IF 2020 = 2,503; Q2)

European Archives of Oto-Rhino-Laryngology (2021) 278:2899–2906
https://doi.org/10.1007/s00405-021-06751-3

LARYNGOLOGY



Evolution of voice after transoral laser cordectomy for precancerous lesions and early glottic cancer

Lucia Staníková¹ · Karol Zeleník^{1,2} · Martin Formánek^{1,2} · Jana Seko¹ · Radana Walderová¹ · Peter Kántor^{1,2} · Pavel Komínek^{1,2}

Received: 28 January 2021 / Accepted: 11 March 2021 / Published online: 18 March 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Purpose To evaluate voice quality evolution after a transoral laser cordectomy (TLC) for precancerous lesions and early glottic cancer.

Methods This prospective study enrolled 18 patients scheduled for TLC for high-grade dysplasia, Tis, T1, and T2 glottic squamous cell cancers, from May 2017 to March 2020. Patients were grouped according to the extent of TLC: Group I ($n = 11$, 61.1%): unilateral subepithelial or subligamental cordectomy; Group II ($n = 7$, 38.9%): unilateral transmuscular, total, or extended cordectomy. Voice quality parameters, including dysphonia grade (G), roughness (R), breathiness (B), maximal phonation time (MPT), jitter, and shimmer, were evaluated before, and at 6 weeks and 6 months after the TLC.

Results In Group I, the degree of G and R items remained without substantial improvement 6 weeks after surgery; however, improved above the pre-surgery level up to 6 months after surgery. The MPT, jitter, and shimmer did not change significantly at 6 weeks or 6 months post-TLC. In Group II, G, R, and B remained significantly impaired even 6 months post-surgery. Jitter, and shimmer worsened at 6 weeks, but reached preoperative levels at 6 months post-surgery. MPT was significantly worse at 6 weeks and remained deteriorated at 6 months post-surgery. All measured parameters were significantly worse in Group II than in Group I at 6 weeks and 6 months post-surgery. No patient required a phonosurgical procedure.

Conclusion After a TLC, voice quality evolution depended on the extent of surgery. It did not improve at 6 weeks post-surgery. Improvements in less extent cordectomies occurred between 6 weeks and 6 months post-surgery. Understanding voice development over time is important for counseling patients when considering phonosurgical procedures.

Keywords Precancerous laryngeal lesions · Early glottic cancer · Cordectomy · Quality of voice · Vocal function

Introduction

Transoral laser cordectomy (TLC) and radiotherapy are both considered highly effective treatment modalities for patients with precancerous lesions of the vocal cords and early glottic cancer [1, 2]. Both methods provide excellent disease-free intervals, overall survival, and larynx preservation for T1–T2 carcinoma [3–6]. However, TLC offers several advantages over radiotherapy, such as one-session

therapy, short hospitalization, reduced morbidity, and high cost-effectiveness [2, 3, 7]. In addition to survival, voice outcomes are important for posttreatment quality of life; therefore, starting from the time TLC was introduced, voice outcomes have been frequently discussed [8]. According to several studies, long-term voice outcomes (6–24 months) have been excellent after a subepithelial or subligamental cordectomy, but after more extended surgeries, voice outcomes remain poor, similar to preoperative tumor-associated dysphonia [4, 8–10]. Based on those findings, TLC is currently recommended, even for voice professionals (e.g., singers, sports casters, public speakers etc.), when a subepithelial or subligamental cordectomy is planned.

To date, the time period for voice recovery after TLC has not been examined. It is highly important for voice professionals to know when their voice will return. Therefore, the present study aimed to evaluate the development of voice

✉ Karol Zeleník
karol.zelenik@fno.cz

¹ Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, University Hospital Ostrava, 17. Listopadu 1790, 708 52 Ostrava, Czech Republic

² Department of Craniofacial Surgery, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

quality after an endoscopic cordectomy for precancerous lesions or early glottic cancer, during the early postoperative period, and to assess differences in voice pattern evolution with different extents of surgery.

Materials and methods

This prospective study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki, the requirements of good clinical practice, and all applicable regulatory requirements. It was approved by the Institutional Review Board. Written informed consent was obtained from all participants before any procedure was initiated.

Patient selection, allocation, and follow-up

This study enrolled patients with high grade dysplasia, carcinoma in situ (Tis), T1, and T2 glottic squamous cell cancer that were scheduled for TLC, from May 2017 to March 2020. No patient received previous radiotherapy or surgical treatment. Patients with symptoms of gastroesophageal reflux were not included in the study.

Patients were divided into two groups, according to the extent of cordectomy. Group I included patients that underwent unilateral subepithelial or subligamental cordectomies (European Laryngology Society [ELS] type I and II resections). Group II included patients that underwent unilateral transmuscular, total, or extended cordectomies (ELS III, IV, and V resections) [11]. We evaluated voice quality before the cordectomy and at 6 weeks and 6 months after the surgical treatment.

Evaluation of voice quality

Perceptual evaluation of voice quality

For perceived voice quality evaluation, voice recordings of patients were randomly analyzed by one of three specialists experienced in voice evaluation, based on the dysphonia grade (G), roughness (R), breathiness (B), items of GRBAS scale, which was introduced by Hirano in 1981. In this scale, the dysphonia grade is the perceived grade of hoarseness, including all voice components; roughness is an instability in voice intensity and frequency; breathiness is perceived air leakage on phonation [12]. Each parameter was scaled as follows: 0—normal, without perceived impairment; 1—small impairment; 2—moderate impairment; and 3—severe impairment. Voice recordings were made during the preoperative examination, 6 weeks and 6 months after TLC with lingWAVES software (version 2.5, Wevosys, Forchheim, Germany). During the recording, a microphone (Sound Level Meter Datalogger CENTER322, New Taipei City,

Taiwan) was set at a constant distance of 30 cm from the patient's mouth, and the patient named the months in a year with a normal voice.

Aerodynamic evaluation

The maximum phonation time (MPT, measured in seconds) was used to assess voice aerodynamics. The MPT was estimated with lingWAVES software (version 2.5, Wevosys, Forchheim, Germany). The patients recorded three trials of speaking the /a:/ vowel with maximum prolongation at a spontaneous, comfortable intensity, loudness, and pitch, after a maximal inspiration. The longest MPT was selected for further assessment.

Acoustic evaluation

The acoustic evaluation was performed with the Vospector program (provided with lingWAVES software). The patients recorded, in standard phonation, the /a:/ vowel at a comfortable frequency and intensity. We analyzed the 2 s after the middle part of the phonation. We estimated the percent jitter (reflecting short-term instability in voice frequency) and the percent shimmer (reflecting changes in voice amplitude) for each patient.

Oncological follow-up

Each patient in our study was re-evaluated at 1 year after the cordectomy. We detected no locoregional persistence or recurrence of laryngeal carcinoma, based on narrow band imaging coupled with high definition endoscopy in a conventional examination [13].

Statistical analysis

The evolution of voice parameters over time was ascertained and analyzed in each group separately. Thereafter, the differences between groups were analyzed. For G, R, and B items which are categorical ordinal data, comparison of absolute and relative frequencies was used for analysis. Numerical parameters of other parameters (MPT, jitter, shimmer) are expressed as the median and interquartile range (IQR), as well as the mean and standard deviation (SD). The Wilcoxon signed-rank test was used to evaluate changes in parameters between examinations. The groups were compared with the Mann–Whitney test. The significance level was set to 0.05. All analyses were performed with the R software (R version 4.0.2, <http://www.r-project.org>).

Results

Study group

This prospective study enrolled 25 patients. Of these, seven (28%) were excluded due to noncompliance with follow-up visits. Among the 18 remaining patients, 17 (94.4%) were men, 1 (5.6%) was a woman, and the median age was 67.0 years (range: 48–83). Group I included 11/18 (61.1%) patients with a mean age of 67.0 years. Group II included 7/11 (38.9%) patients with a mean age of 70.0 years. Age was not significantly different between groups.

Evolution of voice quality

Evolution of perceived voice quality in time using G, R and B evaluation is showed in detail in Fig. 1. In Group I, the degree of G and R items remained without improvement to mild or normal value in more than half of patients 6 weeks after surgery. However, up to 6 months after surgery, G and R improved in most patients and were above the pre-surgery level. Item B did not worse in 6 weeks nor in 6 months after surgery (Fig. 1). Moreover, Group I showed no significant change in MPT over time, and jitter and shimmer did not change significantly between the preoperative examination and 6 weeks after surgery. However, at 6 months after surgery, jitter and shimmer improved significantly.

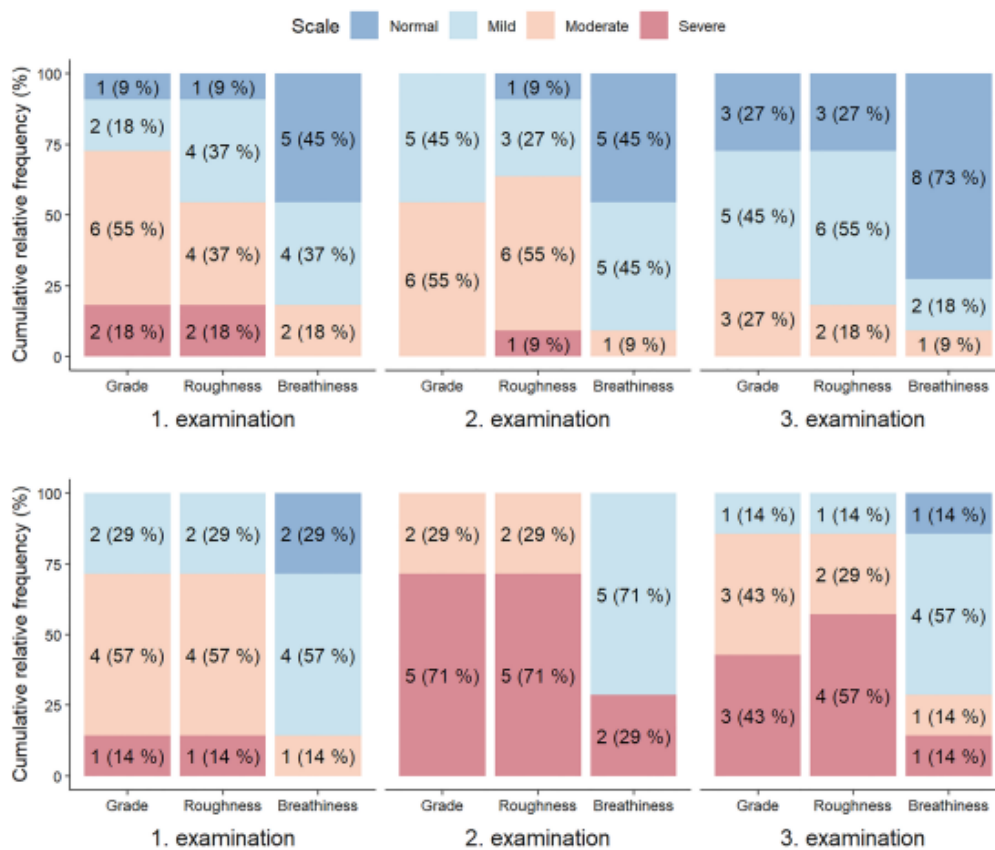


Fig. 1 Evolution of grade, roughness and breathiness in time for Group 1 (upper part) and Group 2 (lower part). 1. Examination—preoperative; 2. examination—6 weeks after surgery; 3. examination—6 months after surgery

Nevertheless, the preoperative and 6-month examinations did not differ significantly (Tables 1, 2; Fig. 2).

In Group II, all items (G, R and B) were significantly worse 6 weeks after surgery. Moreover, only partial improvement could be observed 6 months after surgery. In most patients, G and R items were scored as moderate to severe impairment even 6 months after surgery (Fig. 1).

Group II showed a significant worsening of the MPT between the preoperative and 6-week examinations, and it remained significantly worse at 6 months post-surgery. Jitter and shimmer significantly worsened at 6 weeks after surgery, but they both improved at 6 months after surgery; however, the 6-month values were not significantly different from preoperative values (Tables 1, 2; Fig. 2).

Table 1 Comparison of the changes in maximum phonation time (MPT), jitter and shimmer over time between Group 1 and Group 2

Examination	Group 1		Group 2		P ^c
	MED (IQR) ^a	Mean (SD) ^b	MED (IQR) ^a	Mean (SD) ^b	
MPT					
1	16.0 (10.5–22.0)	17.0 (7.8)	15.0 (11.5–16.0)	14.9 (5.3)	0.784
2	15.0 (10.0–16.5)	15.6 (9.6)	8.0 (6.0–9.0)	7.3 (2.5)	0.026
3	17.0 (11.5–19.5)	16.0 (7.0)	7.0 (5.5–9.0)	7.4 (3.3)	0.010
Jitter					
1	2.2 (0.9–6.6)	4.1 (4.5)	5.3 (2.4–9.8)	6.4 (5.0)	0.285
2	3.0 (0.5–4.8)	3.3 (3.1)	13.3 (10.3–16.2)	13.0 (5.0)	<0.001
3	0.5 (0.3–2.1)	2.1 (3.4)	7.8 (4.9–11.2)	8.4 (6.0)	0.009
Shimmer					
1	19.6 (13.8–25.3)	21.9 (11.0)	22.5 (15.3–29.4)	24.0 (10.5)	0.375
2	19.2 (15.5–26.2)	20.4 (5.6)	32.9 (28.1–41.9)	34.7 (8.9)	0.004
3	13.9 (11.8–20.6)	15.5 (5.3)	25.5 (21.3–32.5)	27.0 (10.7)	0.020

Group 1 European Laryngology Society type I and II resections, Group 2 European Laryngology Society type III, IV and V resections, 1 preoperative, 2 6 weeks post-surgery, 3 6 months post-surgery

^aThe median and the interquartile range

^bThe mean and the standard deviation

^cP value of the Mann–Whitney test

Table 2 Evolution of maximum phonation time, jitter and shimmer between examinations in Group 1 and Group 2

Examination	Group 1			Group 2		
	MED (IQR) ^a	Mean (SD) ^b	P ^c	MED (IQR) ^a	Mean (SD) ^b	P ^c
MPT progress						
1–2	–2.0 (–6.5; 3.5)	–1.5 (6.6)	0.574	–7.0 (–8.5; –6.0)	–7.6 (5.1)	0.036
2–3	1.0 (–0.5; 2.5)	0.5 (4.8)	0.448	0.0 (–2.0; 3.0)	0.1 (3.0)	>0.999
1–3	–1.0 (–3.5; 0.5)	–1.0 (6.0)	0.356	–6.0 (–8.5; –4.0)	–7.4 (5.3)	0.022
Jitter progress						
1–2	–0.4 (–3.9; 0.5)	–0.8 (4.9)	0.520	6.3 (4.5; 8.0)	6.5 (3.2)	0.016
2–3	–0.5 (–2.2; –0.1)	–1.2 (1.7)	0.019	–4.8 (–6.7; –2.1)	–4.6 (2.8)	0.016
1–3	–1.9 (–5.5; –0.1)	–2.0 (6.1)	0.147	1.4 (0.0; 3.9)	1.9 (3.3)	0.219
Shimmer progress						
1–2	0.7 (–6.7; 4.7)	–1.6 (9.6)	0.831	10.9 (8.7; 14.9)	10.7 (6.5)	0.031
2–3	–4.7 (–6.8; –3.0)	–4.9 (2.4)	<0.001	–7.4 (–10.8; –3.3)	–7.7 (5.1)	0.016
1–3	–1.3 (–13.8; 0.7)	–6.4 (11.3)	0.147	2.2 (–2.1; 8.5)	3.0 (6.0)	0.375

Group 1 European Laryngology Society type I and II resections, Group 2 European Laryngology Society type III, IV and V resections, 1 preoperative, 2 6 weeks post-surgery, 3 6 months post-surgery

^aThe median and the interquartile range

^bThe mean and the standard deviation

^cP value of the Wilcoxon signed-rank test

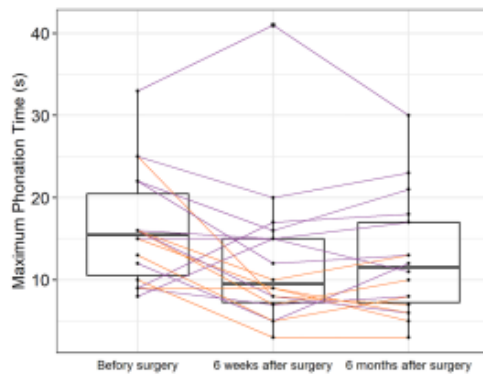


Fig. 2 Changes in the maximum phonation time. Group 1: purple lines; Group 2: orange lines; boxplot shows the median (horizontal line), interquartile range (box), and the maximum and minimum scores

Comparison of voice quality evolution between groups

A comparison of the two groups revealed no preoperative differences in the measured parameters. However, in Group II, all measured parameters (G, R, B, MPT, jitter, and shimmer) were significantly worse than those in Group I at 6 weeks after surgery. Moreover, all parameters in Group II remained significantly worse than those in Group I, even at 6 months after surgery. (Table 1; Figs. 1, 2).

Discussion

TLC and radiation therapy are the main treatment modalities for patients with early glottic cancer (Tis, T1–T2). Success is most frequently measured in terms of the local control rate, laryngeal preservation, or in the long term, overall and disease-free survival [3, 9, 14–18]. Endoscopic laser microsurgery costs significantly less than external beam radiotherapy; therefore, microsurgery has been advocated for the treatment of early glottic carcinomas, particularly T1a carcinoma [3, 7, 16, 19]. Nevertheless, radiotherapy is often considered the treatment of choice, due to the superior voice quality results [20], despite the comparable cure, similar larynx preservation rates, and lower cost of transoral laser microsurgery. Indisputably, aggravated voice quality significantly affects quality of life, particularly for voice professionals, which currently includes a wide range of professions.

Previous studies that compared transoral excisions and radiotherapy reported equivalent [2, 14, 21, 22] or better voice quality results with radiotherapy [23, 24]. However,

a later study found that the superiority claim resulted from the heterogeneity of surgical procedures for T1 vocal cord cancer, and that different extents of cordectomy might be necessary for a single TNM classification. Therefore, it was suggested that it might be more reasonable to rate voice outcomes according to the extent of cordectomy, rather than the TNM classification [25, 26].

A typical example of voice outcome assessments, according to the TNM classification, rather than the extent of cordectomy, was the first randomized controlled trial conducted by Aaltonen et al., in 1998–2008 [27]. They compared voice results between TLC and radiation therapy at 2 years after the treatments for T1a vocal cord cancer. They found that breathiness and asthenia were significantly worse in patients after TLC than after radiotherapy. However, the overall voice quality did not differ significantly between groups at 2 years after treatment. Nevertheless, although the self-reported voice quality did not differ between groups, hoarseness had less of an impact on daily living activities for patients in the radiation group than for patients in the TLC group. When interpreting the results of that study, it is important to note that those authors did not report the exact extent of the surgical procedures; in particular, they did not specify the types of cordectomy performed. They only stated, that “tumor tissue was removed down to a macroscopically healthy muscle layer.” Therefore, it is likely that the transmuscular type of cordectomy was performed in that study. In that case, the results of the study should not be taken as representative of T1a cancers treated with a subepithelial or subligamental cordectomy. Same approach to evaluate voice after cordectomies was utilized by other authors [7, 14, 24].

Fink et al. chose a different approach to assessing voice outcomes in their retrospective study [25]. Those authors analyzed voice results in patients that underwent an ELS Type I, II, or III cordectomy. They determined that the Voice Handicap Index (VHI) improved or showed a trend of improvement postoperatively, and a perceptual analysis did not reveal any significant deterioration in voice quality. The shortcomings of that study were that the exact time point of the postoperative examination was not stated, and the voice parameters were ascertained retrospectively. The VHI was assessed between 1 and 12 months after surgery (median 7 months), and the perceptual analysis was performed between 1 and 3 months after surgery (median 1.9 months). Therefore, it was not possible to trace the evolution of voice quality during the postoperative period.

Currently, most surgeons agree that measuring the extent of cordectomy is crucial in evaluating voice outcomes after a TLC [10, 25, 26, 28]. We chose this approach in the present study. We divided the patients into two groups, according to the extent of cordectomy. Group I included unilateral subepithelial or subligamental cordectomies (ELS I and II cordectomies), and Group II included

unilateral transmuscular, total, or extended cordectomies (ELS III, IV, and V resections). In addition to comparing the static differences between the groups, we compared the evolution of voice quality between groups, during the 6-week and 6-month periods post-surgery. Indeed, no previous study has published information about short-term voice quality after different extents of cordectomy. This information is important for voice professionals and for counselling patients about their plans to return to work.

Our 6-month data were consistent with data reported by Roh et al., who evaluated voice quality at 1 year after a TLC for T1 vocal cord cancer. Those authors reported considerable differences in both the subjective and objective voice outcomes that depended on the extent of surgery. ELS types I and II cordectomies led to significant voice improvements, but more advanced resections led to significantly worse voice outcomes that markedly influenced the quality of life and social activities [9]. Likewise, Peretti et al. showed significant voice improvements after ELS types I and II cordectomies; in those cases, the voice attained nearly normal parameters. On the other hand, after ELS types III, IV, and V cordectomies, the vocal outcomes at 6 months after surgery were not significantly different from the preoperative voice quality. Therefore, those authors concluded that ELS type I and II resections, when indicated, were adequate procedures, even for voice professionals [10]. Nevertheless, those studies only reported results after 6 or 12 months post-surgery, respectively.

The present study provided additional information about the post-surgical evolution of voice quality over a short time period in both groups. We found that, at 6 weeks after an ELS I or II cordectomy (Group I), G and R items remained without improvement; however, improved substantially between 6 weeks and 6 months after surgery. Thus, we could conclude that voice professionals would be not able to return to work for at least 6 weeks after those types of surgery. Furthermore, improvements in the voice above preoperative levels could be expected between 3 and 6 months after surgery. We also found that the other parameters did not significantly change postoperatively, in Group I. In contrast, in Group II, the G, R, and B were significantly worse at 6 weeks after surgery, and the voice did not improve even at 6-month-follow-up. Additionally, the MPT in Group II worsened significantly between the preoperative examination and 6 weeks after surgery, and it remained significantly worse than the preoperative level, even after 6 months. Jitter and shimmer were also significantly worse than the preoperative levels at 6 weeks after surgery; however, at 6 months after surgery, they were not significantly worse than the preoperative (tumor associated) level. Therefore, we concluded that after an ELS III, IV, or V cordectomy, the voice would not improve and might even become worse. Therefore, radiotherapy

might be preferable for patients that consider voice quality crucial.

This issue was studied with a different methodology by van Loon et al. Those authors presented long-term voice outcomes for patients treated for extended T1 and limited T2 glottic carcinoma. Their patients underwent unilateral transmuscular (ELS type III) or bilateral subligamental (ELS type II) resections. The results of that study suggested that the majority of patients could expect to have mild to very moderate dysphonia 1 year postoperatively, based on ratings by experienced listeners and patient self-assessments [28].

Patients with severe dysphonia that previously underwent a total or extended cordectomy (ELS types IV and V resections) could be recommended for laryngeal framework surgery, or medialization laryngoplasty. When medialization surgery is considered, it is necessary to allow a prudent lapse of time between the tumor excision and the phonosurgical procedure [29–31]. A minimum 6-month period between the cordectomy and framework surgery is enforced to allow the vocal cord to scar and form a fibrous “neocord”. Then, voice recovery can be evaluated, and the risk of operating on a patient with undiagnosed early recurrence can be avoided [30]. The reported need for medialization surgery after a total or extended cordectomy was 14.2% [30]. In the present study, after 6 months, all patients had acceptable voice outcomes for casual communication. Therefore, no patient required laryngeal framework surgery or a medialization laryngoplasty.

Conclusion

Our study showed that the evolution of voice quality after a TLC depended on the extent of the resection. Precancerous lesions and early glottic cancers that required limited surgery without muscular infiltration (i.e., ELS types I and II cordectomies) showed good voice quality outcomes. Thus, TLC should be offered for these lesions, even when the patient is a voice professional. However, patients should be informed that voice quality improvements require more than 6 weeks, and good voice quality can only be presumably achieved in 3–6 months after surgery. In contrast, when a more extensive cordectomy is planned, the patient should be informed that voice deterioration is expected, and if voice quality is essential for the patient, radiotherapy should be recommended.

Acknowledgements The authors would like to thank Mgr. Adéla Vrtková from the Department of Applied Mathematics, Faculty of Electrical Engineering and Computer Science, VŠB—Technical University of Ostrava, Czech Republic, for her assistance with the statistical analyses.

Funding This study was supported by the Ministry of Health, Czech Republic, Conceptual Development of Research Organization, MH CZ – DRO - FNOs/2020.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that there is no actual or potential conflict of interest in relation to this article. No benefits in any form have been received or will be received from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this article.

Ethical approval All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- McGuirt WF, Blalock D, Koufman JA, Feehs RS (1992) Voice analysis of patients with endoscopically treated early laryngeal carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101:142–146
- Cragle SP, Brandenburg JH (1993) Laser cordectomy or radiotherapy: cure rates, communication, and cost. *Otolaryngol Head Neck Surg* 108:648–654
- Brandenburg JH (2001) Laser cordotomy versus radiotherapy: an objective cost analysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110:312–318
- Ansarin M, Santoro L, Cattaneo A, Massaro MA, Calabrese L, Giugliano G, Maffini F, Ostuni A, Chiesa F (2009) Laser surgery for early glottic cancer: impact of margin status on local control and organ preservation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 135(4):385–390. <https://doi.org/10.1001/archoto.2009.10>
- Vaculik MF, MacKay CA, Taylor SM, Trites JRB, Hart RD, Rigby MH (2019) Systematic review and meta-analysis of T1 glottic cancer outcomes comparing CO₂ transoral laser microsurgery and radiotherapy. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 48(1):44. <https://doi.org/10.1186/s40463-019-0367-2>
- Gioacchini FM, Tulli M, Kaleci S, Bondi S, Bussi M, Re M (2017) Therapeutic modalities and oncologic outcomes in the treatment of T1b glottic squamous cell carcinoma: a systematic review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 274(12):4091–4102. <https://doi.org/10.1007/S00405-017-4736-Z> (EPUB 2017 SEP 19)
- Brondbo K, Benninger MS (2004) Laser resection of T1a glottic carcinomas: results and postoperative voice quality. *Acta Otolaryngol* 124:976–979
- Vilaseca I, Huerta P, Blanch JL, Fernández-Planas AM, Jiménez C, Bernal-Sprekelsen M (2008) Voice quality after CO₂ laser cordectomy – what can we really expect? *Head Neck* 30(1):43–49
- Roh JL, Kim DH, Kim SY, Park CI (2007) Quality of life and voice in patients after laser cordectomy for Tis and T1 glottic carcinomas. *Head Neck* 29(11):1010–1016. <https://doi.org/10.1002/hed.20625>
- Peretti G, Piazza C, Balzanelli C, Mensi MC, Rossini M, Antonelli AR (2003) Preoperative and postoperative voice in Tis-T1 glottic cancer treatment by endoscopic cordectomy: an additional issue for patient counseling. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112:759–763
- Remacle M, Eckel HE, Antonelli A, Brasnu D, Chevalier D, Friedrich G, Olofsson J, Rudert HH, Thumfart W, de Vincentis M, Wustrow TPU (2000) Endoscopic cordectomy. a proposal for a classification by the Working Committee, European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 257:227–231
- Hirano M (1981) Clinical examination of voice, vol 190. Springer Verlag, New York, pp 3–20
- Staníková L, Šatanková J, Kučová H, Walderová R, Zeleník K, Komínek P (2017) The role of narrow-band imaging (NBI) endoscopy in optical biopsy of vocal cord leukoplakia. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 274(1):355–359. <https://doi.org/10.1007/s00405-016-4244-6>
- Rosier JF, Gregoire V, Counoy H et al (1998) Comparison of external radiotherapy, laser microsurgery and partial laryngectomy for the treatment of T1N0M0 glottic carcinomas: a retrospective evaluation. *Radiother Oncol* 48:175–183
- Smith JC, Johnson JT, Myers EN (2002) Management and outcome of early glottic carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 126:356–364
- Mendenhall WM, Werning JW, Hinerman RW, Amsdud RJ, Villaret DB (2004) Management of T1–T2 glottic carcinomas. *Cancer* 100:1786–1792
- Baird BJ, Sung CK, Beadle BM, Divi V (2018) Treatment of early-stage laryngeal cancer: a comparison of treatment options. *Oral Oncol* 87:8–16. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.09.012>
- Du Y, Shao S, Lv M, Zhu Y, Yan L, Qiao T (2020) Radiotherapy versus surgery—which is better for patients with T1–2N0M0 glottic laryngeal squamous cell carcinoma? Individualized survival prediction based on web-based nomograms. *Front Oncol* 10:1669. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01669>
- Prettyjohns M, Winter S, Kerawala C, Paleri V (2017) Transoral laser microsurgery versus radiation therapy in the management of T1 and T2 laryngeal glottic carcinoma: which modality is cost-effective within the UK? *Clin Otolaryngol* 42(2):404–415. <https://doi.org/10.1111/coa.12807>
- Rydell R, Schalen L, Fex S, Elner A (1995) Voice evaluation before and after laser excision vs. radiotherapy of T1a glottic carcinoma. *Acta Otolaryngol* 115(4):560–565. <https://doi.org/10.3109/00016489509139367>
- Peeters AJGE, van Gogh CDL, Goor KM et al (2004) Health status and voice outcome after treatment for T1a glottic carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 261:534–540. <https://doi.org/10.1007/s00405-003-0697-5>
- Spielmann PM, Majumdar S, Morton RP (2010) Quality of life and functional outcomes in the management of early glottic carcinoma: a systematic review of studies comparing radiotherapy and transoral laser microsurgery. *Clin Otolaryngol* 35:373–382. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2010.02191.x>
- Krengli M, Policarpo M, Manfreda I et al (2004) Voice quality after treatment for T1a glottic carcinoma—radiotherapy versus laser cordectomy. *Acta Oncol* 43:284–289
- Arias F, Arraras JL, Asin G, Uzcanga MI, Enrique Marav E, Chicata V, Eito C, Zarandona U, Mora I, Vila M, Domínguez MA (2014) Quality of life and voice assessment in patients with early-stage glottic cancer. *Head Neck* 37(3):340–346. <https://doi.org/10.1002/hed.23603>
- Fink DS, Sibley H, Kunduk M, Schexnaildre M, Kakade A, Sutton C, McWhorter AJ (2016) Subjective and objective voice outcomes after transoral laser microsurgery for early glottic cancer. *Laryngoscope* 126(2):405–407. <https://doi.org/10.1002/lary.25442>

26. Peretti G, Piazza C, Balzanelli C, Cantarella G, Nicolai P (2003) Vocal outcome after endoscopic cordectomies for Tis and T1 glottic carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112(2):174–179. <https://doi.org/10.1177/000348940311200212>
27. Aaltonen LM, Rautiainen N, Sellman J, Saarihahti K, Mäkitie A, Rihkanen H, Laranne J, Kleemola L, Wigren T, Sala E, Lindholm P, Grenman R, Joensuu H (2014) Voice quality after treatment of early vocal cord cancer: a randomized controlled trial comparing laser surgery with radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 90:255–270
28. van Loon Y, Hendriksma M, Heijnen BJ et al (2019) Voice outcome after unilateral ELS type III or bilateral type II resections for T1–T2 glottic carcinoma: results after 1 year. *Head Neck* 41:1638–1647. <https://doi.org/10.1002/hed.25582>
29. Villaret AB, Piazza C, Redaelli De Zinis LO, Cattaneo A, Cocco D, Peretti G (2007) Phonosurgery after endoscopic cordectomies I. Primary intracordal autologous fat injection after transmuscular resection: preliminary results. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264:1179–1184. <https://doi.org/10.1007/s00405-007-0331-z>
30. Remacle M, Lawson G, Hedayat A, Trussart C, Jamart J (2001) Medialization framework surgery for voice improvement after endoscopic cordectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 258:267–271
31. Zeitels SM, Hillman RE, Franco RA, Bunting GV (2002) Voice and treatment outcome from phonosurgical management of early glottic cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 190:3–20. <https://doi.org/10.1177/0003489402111s1202>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Příloha 9: ZELENÍK, Karol, Martin FORMÁNEK, Radana WALDEROVA, Debora FORMANKOVA a Pavel KOMINEK. Five-year results of vocal fold augmentation using autologous fat or calcium hydroxylapatite. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* [online]. 2021, 278(4), 1139–1144. ISSN 0937-4477. Dostupné z: doi:10.1007/s00405-020-06479-6. (IF 2020 = 2,503; Q2)

European Archives of Oto-Rhino-Laryngology (2021) 278:1139–1144
https://doi.org/10.1007/s00405-020-06479-6

LARYNGOLOGY



Five-year results of vocal fold augmentation using autologous fat or calcium hydroxylapatite

Karol Zeleník^{1,2} · Martin Formánek^{1,2} · Radana Walderová^{1,2} · Debora Formánková^{1,2} · Pavel Komínek^{1,2}

Received: 17 August 2020 / Accepted: 5 November 2020 / Published online: 23 November 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Purpose To evaluate 5-year voice outcomes of vocal fold augmentation (VFA) using autologous fat (AF) injection via direct microlaryngoscopy versus office-based calcium hydroxylapatite (CaHA) injection.

Methods Retrospective study of patients who underwent VFA between 2012 and 2015, with a 5-year follow-up. Patients with a glottic gap of ≤ 3 mm caused by unilateral vocal fold paralysis or vocal fold atrophy were included in the study. VFA was performed using AF injection via direct microlaryngoscopy in 17 patients, and using office-based CaHA injection in 19 patients. Subjective satisfaction with voice, voice handicap index (VHI), and maximal phonation time (MPT) were analyzed pre-injection, and at 12 and 60 months post-VFA.

Results Altogether 36 patients underwent VFA between 2012 and 2015, of whom 5 were excluded within 1 year post-VFA, and 2 were excluded between 1 and 5 years post-VFA. Of the remaining 29 patients, 3 (10.3%) underwent re-intervention at between 1 and 3 years post-VFA. Thus, the 5-year follow-up included 26 patients (72.2%; 11 males and 15 females). At 5 years after surgery, 73.1% of the patients were satisfied with their voice, with no significant between-group difference ($P = 0.307$). The mean improvement of VHI was 28.8 ± 17.82 in the autologous fat group versus 33 ± 26.24 in the CaHA group ($P = 0.458$). MPT improvement was also similar between the two groups: 6.2 ± 4.26 for the autologous fat group versus 6.3 ± 4.34 for the CaHA group ($P = 0.667$).

Conclusions Both AF injection via direct microlaryngoscopy and office-based CaHA injection yielded good and comparable 5-year results.

Keywords Glottic insufficiency · Autologous fat augmentation · Calcium hydroxylapatite · Voice handicap index · Maximal phonation time

Introduction

For over 100 years, vocal fold augmentation (VFA) has been performed for treatment of glottic insufficiency, and yet no single long-term or permanent injection material has been deemed ideal for this purpose. Autologous fat (AF) and calcium hydroxylapatite (CaHA) are both commonly used to obtain long-term results, and are frequently discussed in

the literature [1–3], but data beyond 1 year of follow-up are scarce [4–10]. However, such information is highly important for patients, who typically hope that the effect of the surgery will be permanent. Moreover, when VFA is considered, patients often receive only limited counseling, without data regarding the long-term results of the offered surgery. Thus, patients commonly do not have sufficient information to decide whether their expectations will be better met by VFA or by medialization thyroplasty as a permanent alternative to VFA.

In the present study, we aimed to compare the voice outcomes at 5 years after VFA performed using AF via direct microlaryngoscopy versus office-based CaHA. We also compared these 5-year results with previously published 12-month results to assess the deterioration of voice outcomes over time [11].

✉ Karol Zeleník
karol.zelenik@fno.cz

¹ Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, University Hospital Ostrava, 17. listopadu 1790, 70800 Ostrava, Czech Republic

² Department of Craniofacial Surgery, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Syllabova 19, 70300 Ostrava, Czech Republic

Methods

This retrospective study was approved by the Ethics Committee of the Tertiary Hospital and was registered at ClinicalTrials.gov under identifier NCT02275130.

Inclusion and exclusion criteria

This study included adult patients with glottic insufficiency lasting over 12 months and a glottic gap of ≤ 3 mm caused by unilateral vocal fold palsy or vocal fold atrophy, who underwent VFA between September 2012 and September 2015. Exclusion criteria were reduced or absent mucosal wave, prior chordectomy or radiotherapy, history of previous chronic voice disorders, and concomitant functional voice disorders.

Patients enrollment

From September 2012 to September 2014, VFA was performed using AF via direct microlaryngoscopy under general anesthesia in 17 consecutive patients. From October 2014 to September 2015, VFA was performed as an office-based procedure under local anesthesia using CaHA in an additional 19 consecutive patients.

Surgical procedures

All procedures were performed by a single surgeon experienced in performing VFA. In both groups, VFA was performed by injecting the thyroarytenoid muscle at the point at which a transverse line from the tip of the vocal process laterally intersects the superior arcuate line. For vocal cord atrophy, a second injection was made at the maximum point of the gap, when needed. Patients in both study groups were instructed to maintain complete voice rest for 48 h, followed by relative voice rest for the following week.

Autologous fat

VFA using AF was performed via direct microlaryngoscopy under general anesthesia. AF was harvested from the patient's infraumbilical region, and then the fat lobules were separated from the surrounding connective tissue, cut into 1- to 2-mm pieces, and rinsed in saline. These pieces were placed directly into a Brüning laryngeal injector (Karl Storz, Tuttlingen, Germany). Before injection, palpation of the arytenoid cartilage was performed to exclude cricoarytenoid joint fixation. As recommended when using AF, VFA was performed to 100% overcorrection. To prevent possible leakage of fat particles from the vocal cord, a small

endotracheal tube was used (with a 5.5-cm inner diameter), and the anesthetist was instructed to awake the patient from general anesthesia as gently as possible. The mean injected fat volume was 1.2 cc (range, 0.7–1.6 cc), although determination of the exact amount is not possible since tiny aliquots of fat ooze out when the needle is withdrawn. Moreover, some fat particles could escape the vocal cords when the patient is awoken from general anesthesia.

Calcium hydroxylapatite

VFA with CaHA (Radiesse Voice®, Merz Aesthetics, San Mateo, CA, USA) was performed as an office-based procedure under local anesthesia using a transoral approach. As recommended when using CaHA, VFA was performed to 15–30% overcorrection. The mean injected CaHA volume was 0.6 cc (range, 0.3–1.0 cc).

Follow-up

Patients were scheduled for follow-up examinations at 12 months after VFA. Moreover, all patients were scheduled for further check-ups at 1-year intervals for the next 4 years, enabling assessment of the results at 5 years after initial surgery. A total of seven patients did not attend follow-up examinations between the first and fifth year after surgery, but when contacted by phone, they agreed to attend a 5-year follow-up examination.

Evaluated parameters

Videolaryngostroboscopic findings, subjective satisfaction with voice, voice handicap index (VHI), and maximal phonation time (MPT) were evaluated before injection and at every follow-up assessment. Subjective satisfaction with voice was evaluated using a four-item scale: not satisfied, more unsatisfied than satisfied, pretty satisfied, or very satisfied. The responses "pretty satisfied" and "very satisfied" were considered to indicate satisfaction with the outcome.

Statistical analysis

Demographic descriptors were summarized as mean (and standard deviation) for continuous variables, and as percentage for categorical variables. We analyzed the differences in each outcome measure between injection materials using paired-sample *t* tests. A *P* value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance. Statistical analyses were performed using SPSS version 21.0 (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL, USA).

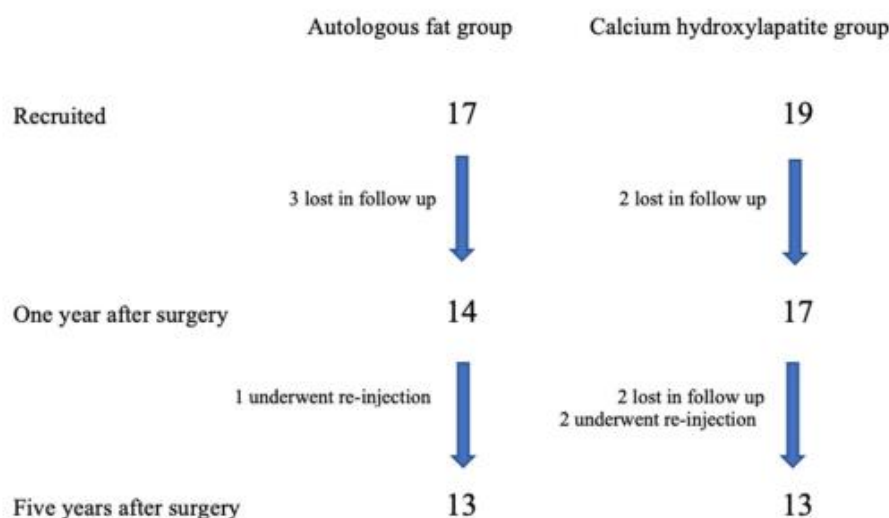


Fig. 1 Diagram of follow-up data for both study groups

Results

This study included a total of 36 patients: 17 (47.2%) in the AF group and 19 (52.8%) in the CaHA group. Overall, 5/36 patients (13.9%), including three from the AF group and two from the CaHA group, were lost to follow-up during the first 12 months post-VFA. Thus, a total of 31 patients—including 14 (45.2%) in the AF group and 17 (54.8%) in the CaHA group—were analyzed at the 1-year follow-up, and these results have been previously published [11]. Another 2/17 patients (11.8%) in the CaHA group were lost to follow-up between 1 and 5 years post-VFA. Due to unsatisfactory voice results, re-injection with the originally injected material was performed in 1/14 patients (7.1%) from the AF group (3 years after the surgery) and 2/17 patients (11.8%) from the CaHA group (2 and 3 years after the surgery) (Fig. 1). These 3/29 patients (10.3%) were excluded from analysis of the 5-year follow-up data. Thus, the analysis of 5-year follow-up data included 13 patients from the AF group and 13 patients from the CaHA group.

Table 1 presents the subjects' demographic data. In two-thirds of the patients, the indication for VFA was vocal fold paralysis, predominantly caused by previous thyroid surgery (Table 2). Table 3 summarizes the 5-year voice results. In total, 19/26 patients (73.1%) reported overall satisfaction with their voices at 5 years after surgery. The mean improvement in VHI was 30.7 ± 20.24 points, and the mean improvement in MPT was 6.2 ± 4.26 s. The

Table 1 Demographics of the study groups

	AF group (N = 13)	CaHA group (N = 13)
Sex	5	6
Male (N = 11)	8	7
Female (N = 15)		
Age in years, mean \pm SD	56.5 \pm 6.62	63.3 \pm 8.12
Voice therapy before surgery, N (%)	12 (92.3%)	11 (84.6%)

Table 2 Etiology of glottal insufficiency in the two study groups

Etiology of glottic insufficiency	AF group (N = 13)	CaHA group (N = 13)	Total
Vocal cord paralysis	8	11	19
Post-thyroidectomy	5	5	10
Spine or intrathoracic surgery	1	1	2
Other ^a	1	1	2
Unknown	1	3	4
Vocal cord atrophy (presbylarynx)	5	2	7
Total	13	13	26

^aOther: after extirpation of vagal nerve neurinoma or after Zenker's diverticulum surgery

evaluated parameters did not significantly differ between groups (Table 3).

When comparing the results between 1 and 5 years after surgery, we must note that two patients were lost to

Table 3 Comparison of 5-year results between the two study groups

Evaluated parameters	Total (N = 26)	AF group (N = 13)	CaHA group (N = 13)	P value
Satisfaction with voice	19 (73.1%)	9 (69.2%)	10 (76.9%)	0.307
VHI improvement	30.7 (20.24)	28.8 (17.82)	33 (26.24)	0.458
MPT improvement	6.2 (4.26)	6.0 (3.42)	6.3 (4.34)	0.667

AF autologous fat, CaHA Calcium Hydroxylapatite, MPT maximal phonation time, VHI voice handicap index

Table 4 Comparison of the results at 1 and 5 years after initial surgery among all patients

Evaluated parameters	One year after surgery (N = 31)	Five years after surgery (N = 26 ^a)
Satisfaction with voice	21 (67.8%)	19 (73.1%)
VHI improvement	33.7 (21.68)	30.7 (20.24)
MPT improvement	5.8 (3.66)	6.2 (4.26)

MPT maximal phonation time, VHI voice handicap index

^aThree patients underwent re-injection and two patients did not attend 5-year follow-up visit

follow-up, and have no information about their voice quality. Moreover, three patients underwent re-intervention between first and fifth year after initial surgery. These patients were excluded from the 5-year statistical analysis, because their voice results after re-intervention were good and these patients were satisfied, but at 2–3 years after surgery, they were not satisfied and agreed with the suggested re-intervention. The remaining 26/29 patients (89.6%) experienced no further substantial deterioration in their voice between the first and fifth year after surgery (Table 4).

Discussion

AF and CaHA are both long-lasting materials that are frequently used for VFA, and the advantages and disadvantages of both materials have been thoroughly described [1–3]. Many studies have confirmed that VFA with AF or CaHA yields excellent short-term (3–6 months) results. However, patients are much more interested in the long-term results. Long-term data are highly important, particularly due to the existence of an alternative permanent surgery: medialization thyroplasty. There is currently no consensus regarding what time period should be considered as “long-term”. Most authors report the data from 12 months post-VFA as long-term results [10–13] and extremely limited results have been reported from beyond 12 months after VFA using AF or

CaHA. Indeed, there are several aspects that complicate the assessment of reliable data from beyond 12 months after VFA.

The main issue is the substantial loss of patients to follow-up over time in both prospective studies and retrospective case series, which has been reported in most previously published studies [4–6]. There are many possible explanations for why patients are lost to follow-up. We can speculate that patients who are satisfied with their results after VFA do not feel a need to see their physician. Moreover, since a significant portion of VFA patients are elderly, they may prioritize dealing with other medical issues. Distance from the Voice Centre might also play a role [5]. On the other hand, patients might not be satisfied with their voice after VFA, but since surgery did not meet their expectations, they do not see a reason for follow-up. For example, in the retrospective study of Benninger et al. data beyond 1 year after VFA with AF were available from only 12/43 patients (27.9%) [4]. Of these 12 patients, 10 (83%) exhibited improved voice symptoms compared to their preoperative baseline. However, it is not possible to accurately estimate the long-term results of all injected patients since data were unavailable from 31 patients (72.1%) [4]. Similarly, Cantarella et al. recruited 148 patients who underwent VFA with AF injected in multiple tunnels during a 15-year study period. However, only 79 (53.4%) of these patients completed follow-up at 12 months, only 11 (7.4%) were followed-up for 3 years, and only 5 (3.4%) for 10 years [5]. Interestingly, for the patients excluded due to incomplete data, some information regarding postoperative voice quality was obtained via phone call, which suggested that these patients did as well as the 79 patients included in the analysis. Therefore, the authors concluded that dropouts did not represent a bias in their study design and results [5]. However, there is a great deal of uncertainty regarding data obtained in such a way.

A second issue complicating the acquisition of long-term results from a large group of patients is the great inconsistency regarding indications for VFA, material used, surgery technique, and outcome measures [9]. These factors make it more difficult to perform a multi-institutional study with the aim of obtaining more robust data. Moreover, the feasibility of performing controlled randomized trials of VFA treatment is complicated by blinding issues and ethical concerns. Thus, most published studies are single-center case series of dozens of patients, and the majority are carried out in a retrospective manner [9]. This also means that meta-analysis of the performed studies provides information of limited value.

Thirdly, there are factors that affect vocal folds over time and thus influence the long-term results of VFA. One important issue is the aging of vocal folds [14]. Particularly in elderly individuals, vocal folds lose volume and tension through the natural process of aging, and it is difficult to establish the extent to which voice deterioration may result

from augmentation material resorption or aging. Voice quality over follow-up can also be influenced by voice abuse and any voice disorders developing during that time (e.g., chronic laryngitis, including reflux laryngitis; neurological disorders; adverse effect of medication; etc.). Therefore, it is important to thoroughly ask the patient about changes in their medical status during every follow-up visit. On the other hand, some voice parameters (e.g., MPT) exhibit better results over time, which can be explained by the patient's learning curve, and can positively influence the "objective" results of VFA.

In the present study, we aimed to determine and compare the results of two VFA materials and procedures, which are both considered to provide long-term results. Although AF has been used for 30 years, few studies report results from beyond 1 year post-surgery [4–8]. In a retrospective review, McCulloch et al. analyzed the outcomes of 31 patients, and found a 4-year success rate of 55% [6]. Similarly, Benninger et al. reported unsatisfactory results more than 1 year after lipoinjection in a retrospective study [4]. In contrast, Umeno et al. followed 73 patients for a median of 4 years after fat injection laryngoplasty, and reported "stable voice results", with reinjection required in only 5 patients (6.8%) [7]. Similarly, Havas and Priestley followed 45 patients for a median of 33 months, and found that 87% had "near-normal voices", and only 13% required a secondary intervention following lipoinjection [8]. Cantarella et al. also found stable results more than 1 year after lipoinjection [5]. Moreover, the authors performed radiological evaluation (computed tomography or magnetic resonance imaging) in 16 patients to determine the long-term survival of the grafted fat, and they did not find clinically relevant graft resorption, which is a main concern regarding long-term lipoinjection outcomes [5].

Nishio et al. performed a unique study, providing answers to many questions regarding fat absorption [15]. The authors used computed tomography to study autologous fat resorption in vocal folds after VFA. They found that the injected fat volume decreased within the first 3 months, and reported a 30% residual rate of injected fat at 3 months post-injection. However, after 3 months, the residual fat volume remained at the same level for up to 24 months after injection [15]. These data appear to support two conclusions: that substantial overcorrection (at least 100%) is needed to provide stable long-term results of VFA using AF, and that no substantial AF resorption occurs beyond 1 year after surgery.

These findings are consistent with our present results. We found that 69.2% of our patients were satisfied with the results of VFA using AF at 5 years after surgery. Moreover, the mean VHI and MPT improvements were stable at 5 years post-VFA. Between the first and fifth year after surgery, we did not note any deterioration of subjective satisfaction with quality of voice, or decrease in mean VHI

and MPT improvement. One patient underwent re-injection 3 years after initial surgery, and was then satisfied with the results at 5 years after surgery.

Regarding the long-term results of CaHA injection, Shen et al. conducted a meta-analysis, in which they evaluated ten studies (only two were prospective) with follow-up durations ranging from 6 to 23.8 months [9]. They confirmed that VFA using CaHA yielded significant improvements in VHI and MPT, with no significant difference compared to the result of medialization thyroplasty [9]. Cantillo-Banos et al. assessed voice results at 6 and 24 months after VFA using CaHA, and found similar results between the 6-month and 24-month follow-up data [16]. No prior studies have reported results from beyond 24 months after VFA using CaHA.

We also reported promising results regarding the long-term effects of CaHA. Only two patients (11.7%) required re-injection between the second and third year after their initial surgery. Among the rest of our patients, 76.9% were satisfied with the results of CaHA injection at 5 years after surgery. Similar to the results of lipoinjection, we found stable mean improvements in VHI and MPT between the first and fifth year after surgery. The 5-year results did not significantly differ between lipoinjection via direct microlaryngoscopy versus office-based CaHA injection.

Limitation of our study was retrospective character of the study and the relatively small number of participants who completed 5-year follow-up. However, this number was similar compared with other studies. Moreover, our present study had many advantages and was a unique investigation. There was a relatively small loss to follow-up over the 5-year study period (7/36; 19.4%). Next, based on good long-term voice results, we can assume that there was no significant resorption of AF and CaHA between the first and fifth year after surgery, and re-intervention was indicated in only 10% of patients during this period. Moreover, we found that there was no significant difference between the two materials and techniques over the 5-year follow-up.

Conclusions

Both AF injection via direct microlaryngoscopy and office-based CaHA injection yielded good 5-year results for the treatment of vocal fold insufficiency. In 10% of our patients, re-intervention was required at between 2 and 3 years after surgery. At 5 years after injection, the results did not differ between the two procedures.

Funding Not applicable.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

References

- Rosen CA, Gartner-Schmidt J, Casiano R et al (2009) Vocal fold augmentation with calcium hydroxylapatite: twelve-month report. *Laryngoscope* 119(5):1033–1041. <https://doi.org/10.1002/lary.20126>
- Sulica L, Rosen CA, Postma GN et al (2010) Current practice in injection augmentation of the vocal folds: indications, treatment principles, techniques, and complications. *Laryngoscope* 120(2):319–325. <https://doi.org/10.1002/lary.20737>
- Mallur PS, Rosen CA (2010) Vocal fold injection: review of indications, techniques, and materials for augmentation. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 3(4):177–182. <https://doi.org/10.3342/ceo.2010.3.4.177>
- Benninger MS, Hanick AL, Nowacki AS (2016) Augmentation autologous adipose injections in the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 125(1):25–30. <https://doi.org/10.1177/0003489415595427>
- Cantarella G, Mazzola RF, Gaffuri M et al (2018) Structural fat grafting to improve outcomes of vocal folds' fat augmentation: long-term results. *Otolaryngol Head Neck Surg* 158(1):135–143. <https://doi.org/10.1177/0194599817739256>
- McCulloch TM, Andrews BT, Hoffman HT, Graham SM, Karnell MP, Minnick C (2002) Long-term follow-up of fat injection laryngoplasty for unilateral vocal cord paralysis. *Laryngoscope* 112(7 Pt 1):1235–1238. <https://doi.org/10.1097/00005537-200207000-00017>
- Umeno H, Chitose S, Sato K, Ueda Y, Nakashima T (2012) Long-term postoperative vocal function after thyroplasty type I and fat injection laryngoplasty. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 121(3):185–191. <https://doi.org/10.1177/000348941212100308>
- Havas TE, Priestley KJ (2003) Autologous fat injection laryngoplasty for unilateral vocal fold paralysis. *ANZ J Surg* 73(11):938–943. <https://doi.org/10.1046/j.1445-2197.2003.02824.x>
- Shen T, Damrose EJ, Morzaria S (2013) A meta-analysis of voice outcome comparing calcium hydroxylapatite injection laryngoplasty to silicone thyroplasty. *Otolaryngol Head Neck Surg* 148(2):197–208. <https://doi.org/10.1177/0194599812464193>
- Carroll TL, Rosen CA (2011) Long-term results of calcium hydroxylapatite for vocal fold augmentation. *Laryngoscope* 121(2):313–319. <https://doi.org/10.1002/lary.21258>
- Zelenik K, Walderová R, Kučová H, Jančatová D, Komínek P (2017) Comparison of long-term voice outcomes after vocal fold augmentation using autologous fat injection by direct microlaryngoscopy versus office-based calcium hydroxylapatite injection. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 274(8):3147–3151. <https://doi.org/10.1007/s00405-017-4600-1>
- Fang TJ, Li HY, Gliklich RE, Chen YH, Wang PC, Chuang HF (2010) Outcomes of fat injection laryngoplasty in unilateral vocal cord paralysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 136(5):457–462. <https://doi.org/10.1001/archoto.2010.42>
- Elbadan HEM, Hussein WKA, Elmaghraby RM (2017) Transcervical fat injection laryngoplasty for unilateral vocal fold paralysis: an easy way to do the job. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 274(12):4161–4167. <https://doi.org/10.1007/s00405-017-4758-6>
- Crawley BK, Dehom S, Thiel C et al (2018) Assessment of clinical and social characteristics that distinguish presbylaryngis from pathologic presbyphonia in elderly individuals. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 144(7):566–571. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2018.0409>
- Nishio N, Fujimoto Y, Hiramatsu M et al (2017) Computed tomographic assessment of autologous fat injection augmentation for vocal fold paralysis. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 2(6):459–465. <https://doi.org/10.1002/liao2.125>
- Cantillo-Baños E, Jurado-Ramos A, Gutiérrez-Jódas J, Ariza-Vargas L (2013) Vocal fold insufficiency: medialization laryngoplasty vs calcium hydroxylapatite microspheres (Radiesse Voice®). *Acta Otolaryngol* 133(3):270–275. <https://doi.org/10.3109/00016489.2012.728717>


Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Příloha 10: ZELENÍK, Karol, Pavel KOMÍNEK, Lucia STANÍKOVÁ a Martin FORMÁNEK*(corresponding author)*. Local Bevacizumab Treatment of Juvenile-Onset Respiratory Papillomatosis Might Induce Multiple Tracheal Pyogenic Granulomas. *Laryngoscope* [online]. 2021, 131(2), E518–E520. ISSN 0023-852X. Dostupné z: doi:10.1002/lary.28928. (IF 2020 = 3,325; Q1)

The Laryngoscope
© 2020 The Authors. *The Laryngoscope*
published by Wiley Periodicals LLC on
behalf of The American Laryngological,
Rhinological and Otological Society, Inc.

Case Report

Local Bevacizumab Treatment of Juvenile-Onset Respiratory Papillomatosis Might Induce Multiple Tracheal Pyogenic Granulomas

Karol Zeleník, MD, PhD; Pavel Komínek, MD, PhD; Lucia Staníková, MD, PhD; Martin Formánek, MD, PhD 

Key Words: Recurrent respiratory papillomatosis, bevacizumab, laryngeal application, adverse effect, pyogenic granuloma.

Laryngoscope, 131:E518–E520, 2021

INTRODUCTION

Juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis (JORRP) is the most common pediatric neoplastic disease of the airway. Its estimated annual incidence is 0.17–1.34 per 100,000 children. Although multiple treatment strategies for JORRP exist, surgical debulking remains the therapeutic mainstay. In the last 10 years, the vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitor, bevacizumab, has been administered to adults and children with severe disease, and it has shown promising effects. For aggressive laryngeal disease, bevacizumab is administered with an intra-lesion or sub-lesion injection. When tracheobronchial involvement is extensive, intravenous bevacizumab administration might be considered.^{1,2}

To date, no adverse effect has been reported for local bevacizumab applications. Here, we present the first case of a multiple tracheal pyogenic granuloma that developed after intra-epithelial bevacizumab application in a 2-year-old child.

Case Report

A 2-year-old girl had been diagnosed with JORRP at 1.5 years old. In the first year after the JORRP diagnosis, she underwent five microlaryngoscopies to ablate papillomas with a CO₂ laser. Each surgery was indicated by

rapid papilloma recurrence and substantial worsening of voice quality, until aphonia occurred (Fig. 1). Each surgery included a tracheoscopy, and no spread of papillomas was detected in the trachea. Bevacizumab (25 mg/mL) was applied locally in the epithelial layer of the vocal cords during the third, fourth, and fifth surgeries, at doses of 12 mg, 16 mg, and 16 mg, respectively. Half the bevacizumab dose was applied under the lesion before papilloma ablation, and half was injected into the epithelium after papilloma removal. For the first four microlaryngoscopies, the airway was managed with endotracheal intubation. However, during the fifth surgery, supraglottic jet ventilation was applied when removing papillomas from the posterior section of the vocal cords and when injecting bevacizumab into the epithelium at the end of surgery.

During the sixth surgery, 3 months later, in addition to a significant papilloma recurrence in the vocal cords, a tracheoscopy revealed multiple white granular mucosal lesions that filled the trachea (Figs. 2 and 3). Nodules did not look like papillomas in white light. Moreover, imaging with the Karl Storz Image1 S system (KARL STORZ, Tuttlingen, Germany) showed no vascularization typical of papillomas (Fig. 4). A histopathological examination revealed granulated tissue with a fibrous “cap” on the surface, consistent with a pyogenic granuloma diagnosis. Based on this diagnosis, the physician chose to manage the child with careful observation over the following weeks. The post-surgical clinical course was uneventful. The child exhibited no dyspnea or significant cough. The next microlaryngoscopy, scheduled 4 months later, showed no evidence of a tracheal granuloma. During the most recent microlaryngoscopy, 4 months later, no tracheal granuloma was detected.

DISCUSSION

Bevacizumab is a human monoclonal antibody that binds to VEGF and prevents its interaction with VEGF receptors (VEGFRs). VEGF plays a role in JORRP development. Previous in vitro studies have shown strong

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

From the Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery (K.Z., P.K., L.S., M.F.), University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic.

Editor's Note: This Manuscript was accepted for publication on June 21, 2020.

The authors have no conflicts of interest to declare.

This work was supported by the Ministry of Health, Czech Republic - conceptual development of research organization (FNOs/2017).

Send correspondence to Martin Formánek, MD, PhD, Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, University Hospital Ostrava, 17 listopadu 1790; 708 52 Ostrava, Czech Republic. E-mail: martin.formanek@fno.cz

DOI: 10.1002/lary.28928

Laryngoscope 131: February 2021

E518

Zelenik et al.: Pyogenic Granulomas in Trachea After Bevacizumab

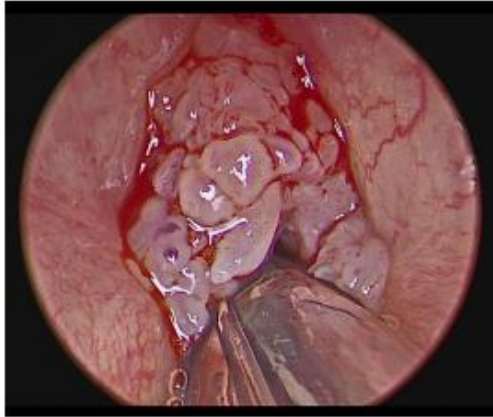


Fig. 1. Direct videolaryngoscopy. Both vocal cords are completely covered with papillomas.

expression of VEGF-A in papilloma epithelium and VEGFR-1 and VEGFR-2 messenger RNAs were detected in the underlying vascular endothelial cells.^{1,2} Local intra-lesional and sub-lesional laryngeal bevacizumab injections have been used to treat JORRP with promising results more than 10 years. To date, no adverse effects of this treatment have been reported. Moreover, no detrimental vocal fold changes were observed during a study that investigated potential pathologic changes in porcine laryngeal specimens injected with bevacizumab.^{1,2} However, paronychia, associated with a pyogenic granuloma,



Fig. 3. Tracheoscopic image of the distal trachea shows multiple white granular mucosal lesions diagnosed as pyogenic granulomas.

has been frequently mentioned among the specific side effects of VEGF inhibitors administered intravenously.³

Pyogenic granuloma is a polypoid, granulated tissue-like capillary hemangioma, with a controversial pathogenesis. It is hypothesized to be a nonspecific tissue reaction to various types of insults. It occurs on the skin and at mucosal surfaces. It might cause a pertinacious cough, and it could potentially obstruct breathing, when localized in trachea. Moreover, pyogenic granuloma was also



Fig. 2. Tracheoscopic image of the proximal trachea shows multiple white granular mucosal lesions diagnosed as pyogenic granulomas.



Fig. 4. Tracheoscopic image displayed in the KARL STORZ IMAGE 1S system. The vascularization typical of papillomas is not present on the granulomas.

reported to cause hemoptysis.^{4,5} As of 2016, only 16 cases of solitary pyogenic granuloma of the trachea had been reported.⁵ In addition, only one case of multiple pyogenic granulomas, remarkably similar to our case, was reported previously.⁴ However, in that case, the granulomas developed in an adult patient after treating lung cancer intravenously with the epidermal growth factor receptor inhibitor, erlotinib.⁴

To our knowledge, this study was the first to describe multiple pyogenic granulomas in a child's trachea. We speculated that the pyogenic granulomas we observed developed due to a reaction in the tracheal mucosa against bevacizumab. It is highly likely that some bevacizumab had unintentionally penetrated into the trachea during an intra-epithelial laryngeal injection. Moreover, we speculated that the jet ventilation might have facilitated the spreading of bevacizumab into the trachea and tracheal epithelium. Due to the lack of another explanation for the presence of a pyogenic granuloma in the trachea of our patient, we made the diagnosis after ruling out other potential causes and based on similarities to a previously published case report of an adult patient.⁴

Several observations supported our diagnosis. First, although granulations might develop in the trachea in response to a wide range of mechanical airway irritations (eg, an intubation cannula or tracheostomy tube), those granulations looked different from the granulations we found, and they were typically localized in the areas where the cannula contacted the trachea. Moreover, no previous report mentioned that multiple pyogenic granulomas might occur as a side effect of jet ventilation. In

addition, multiple pyogenic granulomas did not develop in our patient when endotracheal intubation was applied during a bevacizumab application in previous surgeries.

CONCLUSION

Due to the promising results observed in patients with JORRP, the number of patients that undergo laryngeal intra-epithelial bevacizumab injections is likely to grow. Therefore, it is important to alert clinicians about the potential side effects of administering bevacizumab locally. The present case report showed that bevacizumab could spread into the tracheal mucosa during jet ventilation and could induce multiple pyogenic granulomas. Therefore, we recommend avoiding jet ventilation during an intra-laryngeal bevacizumab injection.

BIBLIOGRAPHY

1. Derkay CS, Bluber AE. Update on recurrent respiratory Papillomatosis. *Otolaryngol Clin North Am* 2019;52:669-679.
2. Kumar N, Prociado D. Airway Papillomatosis: new treatments for an old challenge. *Front Pediatr* 2019;18:383.
3. Balagula Y, Garbe C, Myskowski PL, et al. Clinical presentation and management of dermatological toxicities of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Int J Dermatol* 2011;50:129-146.
4. Putora PM, Benz G, Rodriguez R, Brutsche M, Fruh M. Tracheal granuloma pyogenicum with erlotinib treatment for lung cancer. *Eur Respir J* 2011; 38:1228-1230.
5. Acharya MN, Kotidis K, Loubani M. Tracheal lobular capillary Haemangioma: a rare benign cause of recurrent Haemoptysis. *Case Rep Surg* 2016;2016:6290424.

7 PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORA K TÉMATU PRÁCE

Monografie

1. **Formánek M**, Zeleník K et al. Respirační papilomatóza. 1st ed. Havlíčkův Brod, Czech Republic: Tobiáš. 2022. ISBN 978-80-7311-207-3.

Učební texty

1. **Formánek M**, Zeleník K, Staníková L, Chlíbaek R. Recidivující respirační papilomatóza. Příručka pro praxi. 1. vydání. Praha: Česká společnost otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, 2021. 8. s. Dostupné z: <https://www.otorinolaryngologie.cz › 2021/05 › papilomatoza.html>
2. **Formánek M**, Zeleník K, Staníková L, Jor O. Přímá laryngoskopie. Příručka pro praxi. 1. vydání. Praha: Česká společnost otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, 2021. 8 s. Dostupné z: <https://docplayer.cz/217928495-Prima-laryngoskopie-prirucka-pro-praxi.html>
3. Zeleník K, Komínek P, Matoušek P, **Formánek M**. Extraezofageální reflux – základy diagnostiky a léčby. 1st ed. Ostrava, Czech Republic: Ostravská univerzita, Lékařská fakulta, tisk: AMOS repro. 2014. ISBN 978-80-7464-506-8.

Kapitoly v monografických publikacích

1. Zeleník K, Dršata J, **Formánek M**. Hrtan a průdušnice. In: Chrobok V, Komínek P, Plzák J, Čelakovský Petr, Zeleník K. Otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku. 1st ed. Havlíčkův Brod, Czech Republic: Tobiáš. 2022. ISBN 978-80-7311-205-9.
2. **Formánek M**, Zeleník K. Přímá laryngoskopie. In: Chrobok V, Komínek P, Plzák J, Čelakovský Petr, Zeleník K. Otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku. 1st ed. Havlíčkův Brod, Czech Republic: Tobiáš. 2022. ISBN 978-80-7311-205-9.

Publikace v časopisech s IF

1. **Formánek M**, Formánková D, Hurník P, Vrtková A, Komínek P. Epstein-Barr virus may contribute to the pathogenesis of adult-onset recurrent respiratory papillomatosis: A preliminary study. *Clinical Otolaryngology*. 2021;46(2):373-379. doi: 10.1111/coa.13681. PMID: 33263360. (IF = 2,729; Q2).
2. Zeleník K, Komínek P, Staníková L, **Formánek M**. Local bevacizumab treatment of juvenile-onset respiratory papillomatosis might induce multiple tracheal pyogenic

- granulomas. *Laryngoscope*. 2021;131(2):518-520. doi: 10.1002/lary.28928. PMID: 32633817; PMCID: PMC7818179. (IF = 2,970; Q2).
3. Zeleník K, Hránková V, Vrtková A, Staníková L, Komínek P, **Formánek M**. Diagnostic Value of the Peptest™ in Detecting Laryngopharyngeal Reflux. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(13):2996. <https://doi.org/10.3390/jcm10132996> (IF = 4,964; Q2).
 4. Zeleník K, **Formánek M**, Walderová R, Formánková D, Komínek P. Five-year results of vocal fold augmentation using autologous fat or calcium hydroxylapatite. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2021 Apr;278(4):1139-1144. doi: 10.1007/s00405-020-06479-6. PMID: 33226462. (IF = 3,236; Q2).
 5. Staníková L, **Formánek M**, Hurník P, Kántor P, Komínek P, Zeleník K. Diagnosis of Laryngeal Pemphigus Vulgaris Can Be Facilitated Using Advanced Endoscopic Methods. *Medicina*. 2021;57(7):686. <https://doi.org/10.3390/medicina57070686> (IF = 2,948; Q3).
 6. Staníková L, Zeleník K, **Formánek M**, Seko J, Walderová R, Kántor P, Komínek P. Evolution of voice after transoral laser cordectomy for precancerous lesions and early glottic cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2021;278(8):2899–2906. doi: 10.1007/s00405-021-06751-3. (IF = 3,236; Q2).
 7. Zeleník K, **Formánek M**, Walderová R, Formánková D, Komínek P. Author's reply to Letter to the Editor: „Five-year results of vocal fold augmentation using autologous fat or calcium hydroxylapatite". *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2021;278(6):2161–2162. doi:10.1007/s00405-021-06784-8. (IF = 3,236; Q2).
 8. Zeleník K, **Formánek M**, Walderová R, Formánková D, Komínek P. Five-year results of vocal fold augmentation using autologous fat or calcium hydroxylapatite. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2021;278(4):1139-1144. doi: 10.1007/s00405-020-06479-6. PMID: 33226462. (IF = 3,236; Q2).
 9. Fedorová K, Zeleník K, **Formánek M**, Židlík V, Komínek P. Chondrosarcoma of the Thyroid Cartilage Successfully Treated with Partial Resection of the Thyroid Cartilage. *Ear Nose Throat J*. 2021 Jun 6:1455613211014109. doi: 10.1177/01455613211014109. Epub ahead of print. PMID: 34092079. (IF = 1,3; Q4).
 10. **Formánek M**, Komínek P, Jančatová D, Staníková L, Tomanová R, Vaculová J, Urík M, Šlapák I, Zeleník K. Laryngopharyngeal Reflux Is a Potential Risk Factor for Juvenile-Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis. *Biomed Res Int*. 2019, Article ID 1463896, 5 pages, <https://doi.org/10.1155/2019/1463896> (IF = 2,276; Q3).
 11. Staníková L, Walderová R, Jančatová D, **Formánek M**, Zeleník K, Komínek P. Comparison of narrow band imaging and the Storz Professional Image Enhancement

- System for detection of laryngeal and hypopharyngeal pathologies. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018;275(7):1819-1825. doi: 10.1007/s00405-018-4987-3. PMID: 29713886. (IF = 1,750; Q2).
12. **Formánek M**, Jančatová D, Tomanová R, Komínek P, Zeleník K. Comparison of Impedance and Pepsin Detection in the Laryngeal Mucosa to Determine Impedance Values that Indicate Pathological Laryngopharyngeal Reflux. *Clinical and Translational Gastroenterology.* 2017;8,e123; doi:10.1038/ctg.2017.49 (IF = 4,621; Q1).
 13. **Formánek M**, Jančatová D, Komínek P, Matoušek P, Zeleník K. Laryngopharyngeal reflux and herpes simplex virus type 2 are possible risk factors for adult-onset recurrent respiratory papillomatosis (prospective case-control study). *Clinical Otolaryngology.* 2017;42(3):597-601. doi: 10.1111/coa.12779. PMID: 27759910. (IF = 2,696; Q1).
 14. Zeleník K, **Formánek M**, Matoušek P, Komínek P. Chronic rhinosinusitis and extraesophageal reflux: Who is the candidate for antireflux treatment? *Am J Rhinol Allergy.* 2016;30(2):5-9. (IF = 1,955; Q2).
 15. Zeleník K, Matoušek P, **Formánek M**, Urban O, Komínek P. Patients with chronic rhinosinusitis and simultaneous bronchial asthma suffer from significant extraesophageal reflux. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2015;5(10):944-9. (IF = 2,350; Q1)
 16. **Formánek M**, Komínek P, Matoušek P, Tomanová R, Urban O, Zeleník K. Comparison of Three Methods Used in the Diagnosis of Extraesophageal Reflux in Children with Chronic Otitis Media with Effusion. *Gastroenterol Res Pract.* 2015;2015:547959. (IF = 1,742; Q4).
 17. **Formánek M**, Zeleník K, Komínek P, Matoušek P. Diagnosis of extraesophageal reflux in children with chronic otitis media with effusion using Peptest. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2015;79(5):677-9. (IF = 1,125; Q3).

Publikace v dalších recenzovaných časopisech

1. **Formánek M**, Zeleník K, Komínek P. Zduření na krku u dospělých – kdy myslet na malignitu? *Medicína pro praxi.* 2019; 16(1):53-55. ISSN: 1214-8687.
2. **Formánek M**, Zeleník K, Tomanová R, Komínek P. Recidivující respirační papilomatóza – nové rizikové faktory. *Otorinolaryng. a Foniatic. /Prague/* 2017;66(1):23-27.
3. **Formánek M**, Kučová H, Zeleník K, Komínek P. Současné možnosti terapie juvenilní recidivující respirační papilomatózy. *Čes-slov Pediat.* 2015;70(3):174-178.
4. Syrovátka J, Komínek P, Matoušek P, Tomanová R, Zeleník K, **Formánek M**. Diagnostika extraesofageálního refluxu u dětí se sekretorickou otitidou. *Otorinolaryng. a Foniatic. /Prague/* 2014;63(2):68-74.

5. **Formánek M**, Zeleník K, Dvořáčková J, Komínek P. Chondrosarkom prstencové chrupavky. Otorinolaryng. a Foniat. /Prague/ 2013;62(3):136-139.
6. Komínek P, Matoušek P, **Formánek M**, Zeleník K. Alergie nebo reflux? Extraezofageální reflux z pohledu otorinolaryngologa. Alergie. 2013;3:176-182.

Přednášky publikované ve sborníku abstrakt

1. Hránková V, **Formánek M**, Komínek P, Zeleník K. Význam diety v léčbě mimojícnových symptomů refluxní nemoci. In: 82. kongres České společnosti otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku ČLS JEP: Praha, 22.–24. 10. 2021: sborník abstraktů
2. Hránková V, Zeleník K, Vrtková A, Staníková L, Komínek P, **Formánek M**. In-depth study of the Peptest™ as a diagnostic tool for laryngopharyngeal reflux. In: 19th Czech German ENT Days – Halberstadt 202, September 16-18, 2021: program and abstracts
3. **Formánek M**, Zeleník K, Tomanová R, Šlapák I, Komínek P. Nové rizikové faktory respirační papilomatózy. XVI. Česko-slovenský kongres mladých otorinolaryngologů, Rožnov pod Radhoštěm, 12-14.10.2016, ISBN 978-80-87562-57-4.
4. **Formánek M**, Zeleník K, Komínek P. Využití thuliového laseru v ORL. XVI. Česko-slovenský kongres mladých otorinolaryngologů, Rožnov pod Radhoštěm, 12-14.10.2016, ISBN 978-80-87562-57-4.
5. **Formánek M**, Tomanová R, Komínek P, Zeleník K. Laryngopharyngeal Reflux and Herpes Simplex Virus Type 2 are Possible Risk Factors for Adult-Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis. 15th Czech-German days, Hamm, 23.-25.9.2016
6. **Formánek M**, Zeleník K, Komínek P. Recurrent respiratory papillomatosis and extraesophageal reflux - early results. 3rd Congress of European ORL-HNS, Praha, 7.-11.6.2015.
7. **Formánek M**, Komínek P, Matoušek P, Čábalová L, Zeleník K. Vztah recidivující respirační papilomatózy a extraezofageálního refluxu. XV. Kongres mladých otorinolaryngologů, Košice, 23.-25.10.2014, ISBN 978-80-8152160-7.

Ocenění za publikace k tématu habilitační práce

Laureát Kutvirtovy ceny ČSORLCHHK za 2015	Comparison of Three Methods Used in the Diagnosis of Extraesophageal Reflux in Children with Chronic Otitis Media with Effusion. Gastroenterol Res Pract. 2015;2015:547959.
Finalista Ceny Alberta Schweitzera v medicíně, 2015	
Vítěz Kutvirtovy ceny ČSORLCHHK za 2017	Comparison of Impedance and Pepsin Detection in the Laryngeal Mucosa to Determine Impedance Values that Indicate Pathological Laryngopharyngeal Reflux. Clinical and Translational Gastroenterology. 2017;8,e123.
2. nejlepší práce v časopise s nejvyšším IF za rok 2017 Purkyňova nadačního fondu	Comparison of Impedance and Pepsin Detection in the Laryngeal Mucosa to Determine Impedance Values that Indicate Pathological Laryngopharyngeal Reflux. Clinical and Translational Gastroenterology. 2017;8,e123.
Cena časopisu ORL a foniatrie - původní práce, 2017	Recidivující respirační papilomatóza – nové rizikové faktory. Otorinolaryng. a Foniatic. /Prague/ 2017;66(1):23-27
Laureát Kutvirtovy ceny ČSORLCHHK za 2019	Laryngopharyngeal Reflux Is a Potential Risk Factor for Juvenile-Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis. Biomed Res Int, 2019, 2019, s. 1463896.
Laureát Kutvirtovy ceny ČSORLCHHK za 2022	Respirační papilomatóza. 1st ed. Havlíčkův Brod, Czech Republic: Tobiáš. 2022. ISBN 978-80-7311-207-3.

8 SEZNAM ZKRATEK

BMI	body mass index
CMV	cytomegalovirus
ČLS	Česká lékařská společnost
ČSORLCHHK	České společnost otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku
DISE	spánkové endoskopie horních cest dýchacích
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBV	virus Epstein-Barrové
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
HCD	horní cesty dýchací
HCl	kyselina chlorovodíková
HHV-6	lidský herpesvirus 6
HIV	virus lidské imunodeficiency
HPV	lidský papilomavirus
HSV	herpes simplex virus
HSV-1	herpes simplex virus typ 1
HSV-2	herpes simplex virus typ 2
ChTr	chlamydia trachomatis
IL	interleukin
JEP	Jan Evangelista Purkyně
KTP	draslík-titan-fosfát
LPR	laryngofaryngeální reflux
NBI	Narrow Band Imaging
ORL	otorinolaryngologie
OSA	obstrukční spánková apnoe
PAP	terapie přetlakovou ventilací
RRP	recidivující respirační papilomatóza
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VZV	virus varicella zoster

9 PODĚKOVÁNÍ

Děkuji panu prof. MUDr. Pavlu Komínkovi, Ph.D., MBA, přednostovi Kliniky otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku FN a LF Ostrava, za cenné rady a připomínky při psaní nejen této práce, za příležitosti, které mi na mé klinické i vědecké dráze nabídnul.

Děkuji panu doc. MUDr. Karolu Zeleníkovi, Ph.D., MBA za průvodcovství celou mou kariérou, za naše konzultace, za chirurgické znalosti i klinické zkušenosti, které mi předal, nejvíce však za naše dlouholeté přátelství.

Děkuji také všem kolegům, kteří se mnou spolupracovali na výzkumu a vědeckých pracích, zejména paní MUDr. Lucii Staníkové, Ph.D., dále všem kolegům a zdravotním sestřám, kteří se podíleli na péči o naše pacienty.

Děkuji svému synovi Martinovi za lásku, domov a za to, že mě naučil, co je v životě skutečně důležité.