

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

David ŠTUBLJAR

**VPLIV POLIMORFIZMOV GENOV ZA VNETNI
CITOKIN IL-1 β IN NJEGOV ANTAGONIST IL-1RN
PRI NASTANKU RAKA ŽELODCA IN KRONIČNE
OKUŽBE Z BAKTERIJO *Helicobacter pylori***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

David ŠTUBLJAR

**VPLIV POLIMORFIZMOV GENOV ZA VNETNI CITOKIN IL-1 β IN
NJEVOV ANTAGONIST IL-1RN PRI NASTANKU RAKA ŽELODCA IN
KRONIČNE OKUŽBE Z BAKTERIJO *Helicobacter pylori***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF GENE POLYMORPHISMS FOR
PROINFLAMMATORY CYTOKINE IL-1 β AND IT'S ANTAGONIST
IL1-RN ON THE GENESIS OF STOMACH CANCER AND CHRONIC
INFECTION WITH BACTERIA *Helicobacter pylori***

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Alojz Ihan, dr. med. in za recenzetko doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja, univ. dipl. biol.

Mentor: prof. dr. Alojz Ihan, dr. med

Rezentka: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Alojz Ihan, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani David Štubljar se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

David Štubljar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.61 + 579.25 : 616.33 (043) = 163.6
KG	polimorfizem genov/vnetni citokin/IL-1 β /IL-1RN/rak želodca/gastritis/ kronična okužba/ <i>Helicobacter pylori</i> /genotipizacija
AV	ŠTUBLJAR, David
SA	IHAN, Alojz (mentor)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	VLIV POLIMORFIZMOV GENOV ZA VNETNI CITOKIN IL-1 β IN NJEGOV ANTAGONIST IL-1RN PRI NASTANKU RAKA ŽELODCA IN KRONIČNE OKUŽBE Z BAKTERIJO <i>Helicobacter pylori</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 111 str., 11 pregl., 15 sl., 76 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Okužba s <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>) je ena izmed najpogostejših bakterijskih okužb. Pogosto poteka asimptomatsko, pri nekaterih posameznikih se kaže kot razjeda želodca, pri manjšini bolnikov pa kot rak želodca. Resnost bolezni je tako odvisna predvsem od gostiteljevih genetskih dejavnikov oziroma genetskih variacij v genih za vnetne citokine in njihovih receptorjih. Ti določajo intenzivnost vnetnega odziva na okužbo ter tako prispevajo k različnim izidom okužbe. Študije so pokazale, da sta polimorfizem <i>IL-1B</i> na mestu -511 C>T in variabilna tandemska ponovitev 2 v genu <i>IL-1RN</i> , ki povečata sintezo IL-1 β , povezana s hipoklorhidrijo zaradi <i>H. pylori</i> in nastankom raka želodca. Pri vključenih osebah v študijo smo s serološkimi metodami in metodami kultivacije bakterije dokazali prisotnost okužbe in nato bolnikom skupaj s skupino kontrol izolirali njihovo DNA. Sto sedeminosemdesetim vključenim osebam v študiji smo z genotipizacijo za navedena gena statistično značilno dokazali, da ni prisotne povezave med omenjenima polimorfizmoma ter povečanjem tveganja za razvoj raka želodca. Pokazali pa smo statistično značilno povezavo med polimorfizmom v genu <i>IL-1B</i> *C/C in gastritisom pri skupini bolnikov z gastritisom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.61 + 579.25 : 616.33 (043) = 163.6
 CX gene polymorphism/proinflammatory cytokine/IL-1 β /IL-1RN/gastric cancer/
 gastritis/chronic infection/*Helicobacter pylori*/genotyping
 AU ŠTUBLJAR, David
 AA IHAN, Alojz (supervisor)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme
 in Microbiology
 PY 2011
 TI THE INFLUENCE OF GENE POLYMORPHISMS FOR PROINFLAMMATORY
 CYTOKINE IL-1 β AND IT'S ANTAGONIST IL-1RN ON THE GENESIS OF
 STOMACH CANCER AND CHRONIC INFECTION WITH BACTERIA
Helicobacter pylori
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO XII, 111 p., 11 tab., 15 fig., 76 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is one of the most common bacterial
 infections. Often there are no clinical signs of infection. On the other hand
 some people develop peptic ulcer and minority of patients gastric cancer.
 Progression of disease depends on host genetic factors or genetic variations in
 genes for proinflammatory cytokines and its receptors, which determine
 intensity of inflammatory response to infection and contribute to severity of
 disease. Recently was found, that polymorphism C>T of *IL-1B* gene at
 position -511 and variable number of tandem repeats in intron 2 of *IL-1RN*
 gene increase production of IL-1 β . That increases risk of developing both
 hypochlorhydria and gastric cancer. In the study we determined the infection
 with serological methods and methods of cultivation and then extracted
 patients DNA. 187 patients with control subjects were genotyped for the two
 genes. We have shown that there is no statistically significant association
 between the two polymorphisms and increased risk of gastric cancer.
 However we have indicated an association between polymorphism in *IL-*
*1B**C/C gene and development of gastritis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 EPIDEMIOLOŠKA ŠTUDIJA.....	3
2.1.1 Izbira primerov in ustreznih kontrol.....	3
2.1.2 Analiza: razmerja obetov in interval zaupanja	4
2.2 <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	5
2.2.1 Diagnoza	6
2.2.2 Identifikacija <i>H. pylori</i>	7
2.2.3 Patogeneza <i>H. pylori</i>	8
2.2.3.1 Kolonizacija želodca s <i>H. pylori</i>	11
2.2.3.2 Kronična okužba s <i>H. pylori</i>	12
2.2.4 Bolezni, povezane z okužbo s <i>H. pylori</i>	13
2.2.5 Karcinogeneza želodca	14
2.2.6 Eradikacija bakterije	15
2.3 SYDNEYSKA KLASIFIKACIJA GASTRITISOV	15
2.3.1 Klasifikacija	18

2.3.2	Praktični pristop	20
2.3.3	Ovrednotenje morfoloških spremenljivk	21
2.3.3.1	Gostota <i>H. pylori</i>	22
2.3.3.2	Aktivnost polimorfonuklearnih nevtrofilcev.....	22
2.3.3.3	Kronično vnetje.....	23
2.3.3.4	Atrofija sluznice	23
2.3.3.5	Intestinalna metaplazija.....	23
2.3.3.6	Topografija kroničnega gastritisa.....	24
2.3.3.7	Etiologija.....	25
2.3.3.8	Akutni gastritis	25
2.4	EPIDEMIOLOGIJA RAKA ŽELODCA	26
2.5	<i>H. pylori</i> IN VNETJE	28
2.6	GENSKI SKLOP ZA IL-1.....	30
2.6.1	IL-1β	33
2.6.2	IL-1ra	35
2.6.3	Funkcija ključnih polimorfizmov v genu za IL-1	37
2.6.4	Polimorfizma genov <i>IL-1B</i> -511C/T in <i>IL-1RN</i>*2/2 in rak želodca	39
3	MATERIALI IN METODE	42
3.1	VZORCI BOLNIKOV.....	42
3.2	LABORATORIJSKI MATERIALI IN OPREMA.....	43
3.3	METODE DELA	45
3.3.1	KULTURA <i>Helicobacter pylori</i>	45
3.3.1.1	Princip metode	45
3.3.1.2	Protokol.....	45
3.3.1.3	Identifikacija	47
3.3.2	HISTOLOGIJA	47
3.3.3	SEROLOGIJA	48
3.3.3.1	Princip postopka.....	49

3.3.3.2	Protokol.....	50
3.3.4	IZOLACIJA DNA	52
3.3.4.1	Princip delovanja tehnologije magnetnih delcev	54
3.3.4.2	Protokol.....	55
3.3.5	ROČNA IZOLACIJA DNA.....	57
3.3.5.1	Princip postopka.....	58
3.3.5.2	Protokol.....	59
3.3.6	GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA IL-1β.....	60
3.3.6.1	Iskanje nukleotidnega zaporedja in določanje mesta polimorfizma	60
3.3.6.2	Genotipizacija	61
3.3.6.3	Princip tehnologije KASP za genotipizacijo.....	64
3.3.6.4	Princip protokola PCR s padajočo temperaturo prileganja »Touchdown PCR« – (TD-PCR).....	66
3.3.6.5	Princip sestavljanja protokola »Touchdown«	68
3.3.6.6	Protokol.....	69
3.3.7	DOLOČANJE DOLŽINE POLIMORFIZMA GENA <i>IL-1RN</i>	71
3.3.7.1	Princip metode	72
3.3.7.2	Postopek	73
3.3.7.3	PCR.....	73
3.3.7.4	Elektroforeza.....	73
3.3.8	STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV	74
4	REZULTATI	77
4.1	OVREDNOTENJE SKUPIN.....	77
4.2	KULTURA	80
4.3	SEROLOGIJA	80
4.4	GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMOV	83
4.5	STATISTIČNA ANALIZA.....	85
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	88

5.1	RAZPRAVA	88
5.1.1	Izbira ustreznih preiskovancev in vzorcev	89
5.1.2	Določanje genotipov v genih za vnetne citokine	91
5.1.3	Statistična analiza zbranih genotipov alelov <i>IL-1B</i> in <i>IL-1RN</i>	93
5.2	SKLEPI	94
6	POVZETEK	96
7	VIRI	99

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Inokulacija in inkubacija <i>Helicobacter pylori</i>	46
Preglednica 2: Zaporedja sestavljenih oligonukleotidov	61
Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi za genotipizacijo <i>IL-1RN</i>	72
Preglednica 4: Število in deleži posameznikov, vključenih v študijo.....	78
Preglednica 5: Število vseh analiziranih posameznikov iz skupine primerov.....	79
Preglednica 6: Izračunane vrednosti protiteles IgG proti <i>H. pylori</i> , izražene v enotah/ml (E/ml).....	82
Preglednica 7: Izračunane povprečne vrednosti protiteles IgG proti <i>H. pylori</i> v enotah/ml (E/ml) za posameznega bolnika z rakom želodca.	82
Preglednica 8: Deleži genotipov preiskovancev, vključenih v statistično analizo.	85
Preglednica 9: Frekvence genotipov za IL-1 β na mestu -511 in <i>IL-1RN</i> ter primerjava 29 rakavih bolnikov in 50 bolnikov z gastritisom.	86
Preglednica 10: Frekvence genotipov za IL-1 β na mestu -511 in <i>IL-1RN</i> ter primerjava 29 rakavih bolnikov in 108 posameznikov iz kontrolne skupine.	87
Preglednica 11: Frekvence genotipov za IL-1 β na mestu -511 in <i>IL-1RN</i> ter primerjava 50 bolnikov z gastritisom in 108 posameznikov iz kontrolne skupine.....	87

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz vnetja želodčne sluznice (gastritisa), ki ga povzroča <i>H. pylori</i> (Marshall in Warren, 2005: 1).....	13
Slika 2: Shematski prikaz razporeditve vnetja in atrofije pri različnih tipih atrofičnega in neatrofičnega kroničnega gastritisa (Dixon in sod., 1996: 1164).....	19
Slika 3: Shematski prikaz priporočljivih mest za biopsijo.	21
Slika 4: Shema vizualnega ovrednotenja morfoloških spremenljivk na sluznici želodca (Dixon in sod., 1996: 1165).....	22
Slika 5: Homogenizator tkiv »TissueLyser II« (levo) (Qiagen GmbH, 2011: 1) in generator anaerobne ali mikroaerofilne atmosfere »Anoxomat TM Mark II« (desno) (Mart Microbiology B. V., 2006: 1).....	46
Slika 6: Princip zaznavanja specifičnih protiteles IgG v serumu bolnika (indirektna ELISA) (Goldsby in sod., 1999: 162).....	50
Slika 7: Aparatura za izolacijo nukleinske kisline »MagNA Pure Compact Instrument« (Roche Applied Science, 2003: 11).....	53
Slika 8: Vnaprej napolnjena kartuša z reagenti za takojšnjo uporabo, označena s črtno kodo (Roche Applied Science, 2003: 11).....	54
Slika 9: Princip izolacije nukleinske kisline s tehnologijo magnetnih delcev (Roche Applied Science, 2009a: 1).	57

Slika 10: Princip ročne izolacije nukleinske kisline s tehnologijo centrifugiranja (QIAamp Spin Protocol) (Qiagen GmbH, 2001: 13).....	59
Slika 11: Princip tehnologije KASP za genotipizacijo z alelno diskriminacijo (Amersham Biosciences, 2003: 2).....	66
Slika 12: Sistem »LightCycler 480II« (Roche Applied Science, 2009b: 1).....	69
Slika 13: Prikaz rezultatov v obliki grafa, ki prikazuje 3 različne genotipe (homozigoti z alelom X in Y, heterozigoti z alelom XY) (KBioscience, 2011b: 7).	71
Slika 14: Koncentracija IgG protiteles proti <i>H. pylori</i> v serumu pri rakavih bolnikih v enotah na mililiter (E/ml), v odvisnosti od optične gostote pri 450 nm (absorbanca, OD).	81
Slika 15: Primer enega izmed gelov za določevanje dolžine alelov za <i>IL-1RN</i> z gelsko elektroforezo.....	84

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adenin
AE	pufer za spiranje DNA pri izolaciji DNA
AW	pufer za spiranje DNA pri izolaciji DNA
bp	bazni par
C	citozin
CD	celice CD (angl. cluster of differentiation)
CO ₂	dušikov dioskid
dH ₂ O	destilirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksiribonukleotidi (angl. deoxyribonucleotides)
EDTA	etilendiamintetraoetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	encimskoimunski test (angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
FAM	vrsta fluorescentnega barvila
G	gvanin
GIST	gastrointestinalni stromalni tumor
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
H ₂ SO ₄	žveplova (VI) kislina
HCl	klorovodikova kislina
Hp-NAP	protein <i>Helicobacter pylori</i> , ki aktivira nevtrofilce (angl. <i>Helicobacter pylori</i> neutrophil activating protein)
HWE	Hardy-Weinbergovo ravnovesje (angl. Hardy-Weinberg equilibrium)
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL	interlevkin
K	kontrola
KASP	metoda analize polimorfizmov (angl. KBioscience Competitive Allele-Specific PCR)
kb	kilobaza
KOD	Kasp On Demand
Ktaq	polimeraza Taq
L	dolg alel (angl. long allele)
LPS	lipopolisaharid (angl. lipopolysaccharide)

m	vmesna regija gena <i>vac A</i> (angl. middle)
MALT	limfom sluznično-limfoidnega tkiva (angl. mucosa-associated lymphoid tissue)
McF	McFarland
MgCl ₂	magnezijev klorid
MHK	gojišče Müller-Hinton s konjsko krvjo
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (angl. messenger ribonucleic acid)
NCBI	baza podatkov zaporedij DNA (angl. National Center for Biotechnology Information)
NF	jedrni dejavnik (angl. nuclear factor)
NH ₃	amonijak
NO	dušikov oksid
OD	optična gostota (angl. optical density)
OR	razmerje obetov (angl. odds ratio)
PAI	otoki patogenosti (angl. pathogenicity islands)
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphate buffer solution)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)
ROX	5-karboksi-X-rodamin sukcinimidil ester
s	signalna regija gena <i>vacA</i> (angl. signal)
S	kratek alel (angl. short allele)
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. single nucleotide polymorphism)
T	timin
TD-PCR	verižna reakcija s polimerazo s padajočo temperaturo prileganja (angl. Touch-Down PCR)
TFSS	sekrecijski sistem tipa IV (angl. type four secretion system)
TNF	tumor nekrotizirajoči faktor (angl. tumor necrosis factor)
TNM	klasifikacija malignih tumorjev (angl. tumor, lymph nodes, metastasis)
V	volt
VIC	vrsta fluorescentnega barvila
VNTR	spremenljivo število tandemskih ponovitev (angl. variable number tandem repeats)

1 UVOD

Rak želodca je eden izmed najpogostejših rakov v Sloveniji in po svetu. Velja za enega izmed rakov z najslabšo možnostjo preživetja in se kategorizira kot multifokalna bolezen, ki je rezultat posameznikove genetske predispozicije in izpostavljenosti določenim okoljskim dejavnikom (Jorge in sod., 2010). Njegova incidenca je med najvišjimi v Evropi in svetu, zaradi česar je na področju preprečevanja in zgodnjega odkrivanja boleznih smiselno ukrepati. Čeprav svetovna incidenca pada, je rak želodca še vedno drugi najpogostejši vzrok smrti zaradi raka na svetu. Po Lauren-ovi klasifikaciji delimo rak želodca na dva glavna histološka tipa; difuzni in intestinalni. Rak želodca je rezultat kombinacije vpliva okoljskih dejavnikov in specifičnih genetskih sprememb. Pri starejših bolnikih so za razvoj raka ključni predvsem njihovi okoljski dejavniki, medtem ko naj bi pri mlajših to vlogo prevzela genetska predispozicija (Sitarz in sod., 2008). V svetu splošno velja, da je nastanek 65 % do 80 % raka želodca povezan z okužbo z bakterijo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Čeprav je okužba s *H. pylori* pogosta bakterijska okužba, za rakom želodca zbolijo le 1 % do 2 % okuženih. Bakterija je prisotna pri 90 % bolnikov s kroničnim gastritisom v antrumu želodca. Do razvoja raka pride postopoma od okužbe z bakterijo, razvoja atrofije in nato karcinogeneze. Poleg okužbe so za nastanek raka pomembni tudi gostiteljevi dejavniki, predvsem točkovne mutacije v določenih genih, ki vplivajo na inhibicijo izločanja želodčne kisline in prirojenega imunskega odziva (Jorge in sod., 2010). Prav tako so pomembni vplivi okolja med katerimi velja omeniti prehrano, kajenje, uživanje alkohola (Glas in sod., 2004). Povezava med genskimi polimorfizmi in gostiteljevimi citokini ter narava in resnost izida boleznih še ni povsem poznana (Murphy in sod., 2009).

1.1 NAMEN DELA

Cilj diplomske naloge je bil ugotoviti kateri so tisti gostiteljevi genetski dejavniki, ki na nastanek raka želodca najbolj pomembno vplivajo. Skušali smo odkriti, kako določena sprememba na določenem mestu v genu vpliva na nastanek raka želodca. Vpliv gostiteljevih dejavnikov smo v naši nalogi poskušali ugotoviti s študijo nekaterih, v literaturi najpogosteje opisanih polimorfizmov genov za citokine, ki so se izkazali kot dobri napovedni dejavniki za nastanek raka želodca ob sočasni okužbi s *H. pylori*. Osredotočili smo se na polimorfizme genov za vnetni citokin IL-1 β in njegov antagonistični citokin IL-1ra.

V Sloveniji po znanih podatkih kljub visoki incidenci bolezni tovrstnih raziskav niso izvajali. Nadejamo si, da bodo rezultati naše raziskave pomembno pripomogli k osvetlitvi dejavnikov, ki so pomembni za nastanek raka predvsem v naši populaciji ljudi. Po eni strani bi lahko pripomogli za identifikacijo oseb z najvišjim tveganje za nastanek raka želodca. Po drugi strani pa bi lahko bili kot podlaga za morebitni agresivnejši pristop do okužbe in eradikacije bakterije iz želodčne sluznice okuženih oseb.

1.2 HIPOTEZA

Vsak izmed posameznih polimorfizmov za naveden citokin in njegov receptor poveča možnost za nastanek želodčnega raka, povezanega z okužbo z bakterijo *H. pylori* v skupini bolnikov iz Slovenije. V kolikor ima posamezen bolnik katerega izmed preiskovanih polimorfizmov za *IL-1B* -511*T/T in *IL-1RN**2/2 in je obenem okužen z bakterijo *H. pylori*, se možnost za razvoj raka želodca močno poveča. Če ima bolnik oba izmed preiskovanih polimorfizmov genov in je obenem okužen z bakterijo *H. pylori*, vpliv prisotnosti teh dejavnikov sestavlja najboljšo kombinacijo za nastanek želodčnega raka.

2 PREGLED OBJAV

2.1 EPIDEMIOLOŠKA ŠTUDIJA

Epidemiološka študija primerov s kontrolami je prvi korak pri iskanju vzroka bolezni (Gordis, 2004), saj omogoča prepoznati povezavo med boleznijo in izpostavljenostjo določenemu dejavniku tveganja. Tako najprej določimo skupino posameznikov z boleznijo ter skupino posameznikov, ki te bolezni nima (Lewellen in Courtright, 1998). Skupini poimenujemo skupina primerov oziroma kontrol. Nato določimo delež primerov, ki so bili izpostavljeni iskanemu dejavniku in delež tistih, ki niso bili izpostavljeni. Enako naredimo za kontrolno skupino. V kolikor je prisotna neka povezava med boleznijo in proučevanim dejavnikom, nam študija pokaže, da je prevalenca izpostavljenosti višja pri osebah z boleznijo (Gordis, 2004).

Glavna značilnost študije primerov s kontrolami je, da se študija začne z ljudmi, ki imajo bolezen in se jih potem primerja z ljudmi brez te bolezni ter se nato proučuje dejavnike, ki povzročajo to bolezen (Gordis, 2004). To pomeni, da gre za retrospektivno študijo, saj raziskovalec že pozna zdravstveno stanje vsakega posameznika, ki je začetna točka glede na katero se nato proučuje dejavnike tveganja za bolezen (Lewellen in Courtright, 1998). Taka študija je primerna tudi za proučevanje redkih bolezni, saj ne potrebujemo izredno velike populacije bolnih, ker lahko dobimo primere iz arhivskih podatkov. Izvedba študije je poceni in relativno hitra (Gordis, 2004).

2.1.1 Izbira primerov in ustreznih kontrol

Primere se lahko izbere iz različnih virov; od hospitaliziranih bolnikov do bolnikov v različnih registrih. Najbolj optimalna izbira je izbira incidenčnih in prevalanetnih primerov, se pravi na novo diagnosticiranih bolnikov ter bolnikov, ki imajo bolezen diagnosticirano že nekaj časa.

Pri prevalentnih primerih je razlog izključitve posameznikov iz analize lahko hitra umrljivost nekaterih bolnikov, kar prispeva k nereprezentativnosti skupine primerov in napačno ovrednoti dejavnike tveganja samo na preživele. Pri uporabi incidenčnih primerov izključimo vse bolnike, ki so umrli pred postavljeno diagnozo (Gordis, 2004).

Lastnosti skupine kontrol so podobne posameznikom v skupini primerov, razen tega da nimajo bolezni. Skupne lastnosti so večinoma starost, spol, rasa in družbeno-ekonomski status posameznika (Gordis, 2004). Ključna lastnost pa je tudi enaka tendenca oziroma tveganje za razvoj bolezni, kot pri primerih (Lewellen in Courtright, 1998). Izberemo lahko posameznike, ki niso hospitalizirani ali so hospitalizirani zaradi drugačnih razlogov, ki nimajo vpliva na proučevano bolezen. Pogosto se uporablja večje število kontrol kot primerov, saj s tem povečamo samo statistično moč študije, lahko pa se proučuje tudi več različnih skupin kontrol (Gordis, 2004).

2.1.2 Analiza: razmerja obetov in interval zaupanja

V študijah primerov s kontrolami se ne da izračunati incidence izpostavljenih posameznikov v skupinah primerov in kontrol, saj začnemo raziskavo že z bolnimi ljudmi in tako nimamo podatkov za incidenco bolezni pri primerih in kontrolah (Gordis, 2004). Zato tudi ne moremo določiti nekega relativnega tveganja, ki determinira povezavo med dejavnikom tveganja in boleznijo. Tako namesto relativnega tveganja določamo razmerje obetov, ki je zelo dober približek relativnemu tveganju (Meirik, 2008). To je merilo za statistično moč povezave med dejavnikom tveganja in zdravstvenim stanjem. Pri tem se najprej izračuna frekvenco posamezne spremenljivke v obeh skupinah. Razmerje obetov (OR) pa predstavlja razmerje med tveganjem izpostavljenosti v skupini primerov in tveganjem izpostavljenosti v kontrolni skupini. Pomembno je izračunati interval zaupanja za posamezno razmerje obetov, saj nam pove ali je bila povezava najdena naključno in tako ni statistično značilna (Lewellen in Courtright, 1998). Za določevanje statistično značilne povezave in ugotavljanja ali rezultati

eksperimenta potrjujejo hipotezo, lahko poleg OR izračunamo tudi Pearsonov koeficient s statistično analizo χ^2 , kjer primerjamo izračunano vrednost statistike z napovedano vrednostjo prostostnih stopenj, ki jo določa interval zaupanja. V kolikor je dejanska izračunana vrednost večja kot pričakovana napovedana vrednost, sprejmemo ničelno hipotezo (Meirik, 2008).

2.2 *HELICOBACTER PYLORI*

Helicobacter pylori povzroča bolezni gastrointestinalnega trakta. Bakterija lahko naseljuje neprijazno okolje želodca in povzroča 90 % vseh razjed želodca ali duodenuma in rakava obolenja (Struhers in Westran, 2003).

Okužba z bakterijo *H. pylori* je ena izmed najpogostejših bakterijskih okužb. Z njo je okužena polovica svetovne populacije, tako da je *H. pylori* prisoten v želodcu pri več kot 50 % vseh ljudi. Okužba največkrat poteka asimptomatsko, pri približno 10 % okuženih se konča s peptično razjedo želodca ali dvanajstnika in pri 1 % do 2 % bolnikov z rakom želodca (Kusters in sod., 2006). Povzroča kronični atrofični gastritis z vnetjem in je tako najpogostejši vzrok za razvoj kroničnega gastritisa na svetu (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).

H. pylori je mikroaerofilen po Gramu negativen spiralno zaviti bacil, širok 0,3 do 1 μm in dolg 1,5 do 10 μm , ki ima sposobnost kolonizirati in okužiti želodec. Bakterija preživi v plasti sluznice, ki prekriva površino želodčnega epitelija in zgornji del želodčnih jamic – foveol. Do okužbe ponavadi pride v otroštvu. Pri okužbi bakterija preide skozi sluznični sloj in se ustavi na luminalni površini želodca. Razvije se intenziven vnetni odgovor spodnjega tkiva (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009). Bakterija proizvaja hidrogenaze, ki ji omogočajo pridobivanje energije z oksidacijo molekularnega vodika (H_2), ki ga proizvajajo intestinalne bakterije. *H. pylori* je oksidaza, katalaza in ureaza pozitivna bakterija, ki lahko tvori biofilme in se tako spremeni iz spiralno zavite bakterije, podobne skupini bakterij *Campylobacter*, v

živo a nekultivirajočo kokoidno obliko. Kot taka se lahko pritrudi le na epiteljske celice želodca *in vitro* (Olson in Maier, 2002).

H. pylori lahko preživi v neprijaznem kislem okolju želodca mesece oziroma leta preden se bolezen klinično pokaže. Kolonizira epiteljske celice v želodcu in duodenumu. Bakterija ima polarne bičke. Gibljivost bakteriji omogoča bivanje na sluznici oziroma v sami plasti. Amonijak (NH₃), ki ga proizvaja s pomočjo ureaze, nevtralizira kislino želodca. Adhezija z adhezini in citotoksin povzročata atrofijo želodca. Adhezija, citotoksin, toksični vpliv amonijaka in močan protivnetni odziv vodijo do razvoja gastritisa ter kasneje do peptične in duodenalne razjede (Struhers in Westran, 2003). Okužba je ključen element razvoja razjede želodca in atrofičnega gastritisa (Ishihara in sod., 2004). Dolgoročne posledice le te se lahko kažejo kot rakava obolenja, in sicer adenokarcinom in limfom (Struhers in Westran, 2003).

Lipopolisaharid (LPS), ki predstavlja sestavni del zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij, je prevladujoči aktivator celic imunskega in vnetnega odziva. LPS je eden izmed virulentnih faktorjev, ki so vpleteni v razvoj samega gastritisa. Aktivacija monocitov in želodčnih epitelnih celic vodi do proizvodnje več različnih vnetnih citokinov, kisikovih radikalov in sprožilnih dušikovih oksidov (NO) (Ishihara in sod., 2004).

2.2.1 Diagnoza

Okužba s *H. pylori* najpogosteje poteka asimptomatsko. Bakterija je prisotna v želodcu pri več kot 50 % vseh ljudi in večina nima posebnih kliničnih znakov in težav zaradi okužbe. Tako večina ljudi niti ne ve, da ima prisotno bakterijo v želodcu. Pri nekaterih se pojavijo občasne ali stalne bolečine v predelu zgornjega dela trebuha ali spodnjega dela prsnega koša kar strokovno imenujemo dispepsija. Dispepsija in bolečine se razlikujejo glede na jakost in pridružene simptome in lahko zdravnika opozorijo na okužbo s *H. pylori*. Poleg bolečine v trebušnem predelu so pogosti simptomi slabost, bruhanje ter pomanjkanje apetita. Redko se

pojavi krvavenje, kar nato vodi do anemije in utrujenosti. Bolezen se lahko identificira ter dokaže na več načinov. Za dokaz okužbe lahko izvajamo invazivne ali neinvazivne teste. Zlati standard so še vedno invazivni testi kot so endoskopija, biopsija in histopatološki pregled. Ponavadi se dela še kultura bakterije. Od neinvazivnih testov je najpogostejši ureazni dihalni test, ki temelji na tem, da učinkovita ureaza, ki jo izloča bakterija, spreobrne ^{13}C -ureo v produkt, ki vsebuje $^{13}\text{CO}_2$. Potem ko bolnik zaužije označeno ureo, se meri izdihani označeni CO_2 . Poleg tega poznamo še serološki test, pri katerem se v bolnikovi krvi določajo protitelesa proti *H. pylori* (Struhers in Westran, 2003). Protitelesa proti bakteriji lahko določimo tudi v blatu okuženega (Safe Drinking Water Foundation, 2009).

2.2.2 Identifikacija *H. pylori*

S *H. pylori* povzročen kronični gastritis napreduje z dvema značilnima topografskima vzorcema z različnimi kliničnimi posledicami:

- Za antrum prevladujoči – antralni gastritis je značilno vnetje samo antruma. Posamezniki z peptičnimi razjedami nazorno prikazujejo primere za ta gastritis.
- Multifokalni atrofični gastritis pa je značilen za korpus in antrum. Viden je razvoj atrofije želodca (izguba žlez želodca) in nadomestitev izgubljenih žlez z intestinalnim epitelijem (intestinalna metaplazija). Posledica tega gastritisa so posamezniki s karcinomom želodca in želodčnimi razjedami.

Ljudem z zgornjimi težavami se odvzame bioptične vzorce želodca, ki se jih potem ustrezno obdelata in nacepi na specifična gojišča za *H. pylori*. Najpogostejša metoda identifikacije bakterije je kultura in potem določanje občutljivosti za antibiotike za uspešno zdravljenje. Za pravilen odvzem po Sydney-ski klasifikaciji gastritisov je potrebno odvzeti vsaj 4 vzorce, in sicer 2 biopsiji korpusa in 2 biopsiji antruma. Biopte sluznice želodca se transportira v transportnem gojišču Portagerm pylori (Biomérieux) v 2 do 4 dneh pri sobni temperaturi ali v

hladilniku pri +4 °C. Biopte se homogenizira v pufru in homogenate nacepi na selektivna gojišča za *H. pylori*. Inkubira se mikroaerofilno pri 37 °C 72 ur.

Identifikacija temelji na pregledu plošč po treh dneh, kjer so opazne tipične kolonije *H. pylori*, ki so drobne (do 0,5 mm) in prozorne. Za dodatno identifikacijo osamljenih kolonij naredimo mikroskopski preparat obarvan po Gramu in dokaz encimov ureaze, katalaze in oksidaze.

H. pylori se nahaja v sluzi, ki pokriva površino epitelija, in v foveolah. Bakterijo histološko dokažemo z barvanjem s hematoksinom in eozinom (H&E), če je le te veliko. V kolikor je prisotnih malo bacilov pa uporabljamo druge metode barvanja: Warthin-Starry, Cresyl-violet, Giminez, Alcian yellow-toluidine blu-Leung, Genta, Giemsa, May Grünwald Giemsa. Najpogostejša barvanja histoloških preparatov so barvanja H&E, May Grünwald Giemsa in srebrenje. Vzorce za dokaz bakterije odvezamemo pred zdravljenjem okužbe (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).

2.2.3 Patogeneza *H. pylori*

Patogeneza *H. pylori* še ni povsem poznana. *H. pylori* je genetsko heterogena bakterija, zato vsi sevi ne igrajo enako vlogo pri razvoju malignosti. Ljudje, okuženi s sevom *H. pylori*, ki izloča vakuolizirajoči toksin A (vacA), so bolj dovzetni za razvoj peptičnih razjed kot ljudje, okuženi s sevom, ki tega toksina ne izloča. Drug virulentni dejavnik je povezan z otoki patogenosti *H. pylori* (PAI – angl. pathogenicity island). PAI vsebujejo zaporedja več genov in kodirajo citotoksin CagA (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009). Toksin CitoCag A je pomemben dejavnik bakterijske virulence in hkrati predstavlja označevalec za prisotnost Cag-PAI v določenih sevih. Sevi, ki proizvajajo protein CagA (CagA⁺) so povezani z večjim tveganjem za razvoj karcinoma želodca in peptičnih razjed, saj povzročijo močan vnetni odziv z infiltracijo nevtrofilcev, kot sevi CagA⁻ (Barbosa in sod., 2009). Sevi, ki vsebujejo v PAI skupine genov *cag* sprožijo večjo stopnjo vnetja kot sevi brez teh genov. Mehanizem vključuje

epitelijsko proizvodnjo interlevkina 8 (IL-8) po poti jedrnega dejavnika kappa B (NF- κ B). CagA⁺ sevi povzročijo hud vnetni odziv v povezavi s peptičnimi razjedami, atrofičnim gastritisom in intestinalnim metaplastičnim rakom (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).

Med najpomembnejše virulentne dejavnike *H. pylori* torej spada otok patogenosti *cag* (*cag*-PAI). Njegov pomen v patogenezi peptične razjede in želodčnega raka so potrdile mnoge raziskave Figueireda s sodelavci (2002) in Machado s sodelavci (2001). Geni v okviru *cag*-PAI med drugim kodirajo sekrecijski sistem tipa IV (TFSS – angl. type four secretion system) in protein CagA (Kusters in sod., 2006). Protein CagA se translocira s sekrecijskim sistemom tipa IV (kodira ga *cag*-PAI) v epitelijskih celicah želodca, kjer sproži spremembe v fosforilaciji tirozina različnih celičnih proteinov (Machado in sod., 2002). CagA se ob okužbi prenese v citoplazmo, kjer vstopa v različne znotrajcelične signalne poti in tako vpliva na proliferacijo in preko citoskeleta na morfologijo epitelijskih celic želodca (Kusters in sod., 2006). Prisoten je pri 50 do 70 % sevov *H. pylori* in je označevalec prisotnosti genomskega *cag*-PAI (Kusters in sod., 2006; Machado in sod., 2002). Okužbo s *cagA* pozitivnim sevom *H. pylori* povezujejo z večjim tveganjem nastanka želodčnega raka (Figueiredo in sod., 2002; Machado in sod., 2003). Več genov *cag*-PAI kodira proteine, ki povečajo proizvodnjo vnetnega interlevkina 8 (IL-8) epitelijskih celic. Našli so povezavo med okužbo s *cagA* pozitivnim sevom in tveganjem za razvoj peptične razjede, atrofičnega gastritisa in raka želodca (Machado in sod., 2002). Nedavno so v živalskem modelu dokazali, da je protein CagA brez sočasne okužbe s *H. pylori*, sposoben inducirati nastanek tumorjev v transgenski miški. S tem so dokazali, da je CagA pravzaprav bakterijski onkoprotein (Algood in Cover., 2006).

Drugi virulentni dejavnik je vakuolizirajoči toksin VacA. Njegov gen (*vacA*) je prisoten v vseh sevih *H. pylori* (Machado in sod., 2002), vendar je le približno 50 % sevov takšnih, ki toksin VacA izločajo v okolico. VacA lahko tvori pore v membranah epitelijskih celic in vstopa v citoplazmo, kjer inducira apoptozo celic. Proapoptotična aktivnost VacA predvsem prizadene

parietalne celice, kar ima za posledico zmanjšanje izločanja želodčne kisline in vodi v razvoj želodčnega raka. Določen delež *VacA* lahko ostane vezan na membrano *H. pylori* in na epiteljske celice učinkuje preko še neodkritih receptorjev. Gen *vacA* je polimorfen in vsebuje najmanj dve regiji: signalno (s-signal) in vmesno (m-middle) regijo. Obe regiji se pojavljata v dveh različicah (1 in 2) in sestavljata različne podtipe *vacA* (s regija, ki obstaja kot alel s1a, s1b, s1c ali s2 in regija m, ki je kot alel m1, m2a ali m2b) (Machado in sod., 2002). Največjo vakuolizacijo povzroča podtip s1/m1, srednjo s1/m2, medtem ko podtip s2/m2 ne povzroča vakuolizacije epiteljskih celic (Amieva in El-Omar, 2008; Kusters in sod., 2006). Sev *H. pylori vacA* tip s1 je bolj virulenten kot tip s2 in je v povezavi s povišanim tveganjem za razjede, želodčno atrofijo in rakom želodca. Seva *vacA* s1 in *vacA* m1 sta tudi velikokrat v povezavi s povečano stopnjo vnetja in poškodbami epitelija sluznice želodca (Machado in sod., 2002). V več raziskavah so prisotnost okužbe s sevom *H. pylori vacA* s1/m1 povezovali z večjim tveganjem za nastanek raka želodca (Figueiredo in sod., 2002).

Kljub temu pa zgolj bakterijski virulentni dejavniki niso dovolj za nadaljnji razvoj okužbe, saj jih najdemo tako pri bolnikih z razjedami in rakavih bolnikih. Ključno vlogo tako igrajo gostiteljevi dejavniki, ki uravnavajo imunski in vnetni odziv. Gre predvsem za genske polimorfizme v promotorskih regijah, ki kodirajo vnetne citokine in s svojim delovanjem povečajo sintezo interlevkinov in vodijo do hipoklorhidrije (Barbosa in sod., 2009).

H. pylori lahko preživi v želodčni kislini, ker proizvaja encime, ki nevtralizirajo kislino. Mehanizem omogoča bakteriji vstop v želodec in prehod v sluznico stene želodca. Enkrat ko bakterija vstopi v sluznico, jo imunski odziv ne doseže in je ne more uničiti. Imunski sistem kljub temu pošilja celice imunskega sistema na mesto okužbe. *H. pylori* oslabi zaščitni sloj sluznice želodca in duodenuma, kar omogoča prehod želodčne kisline skozi občutljivi sloj. Kislina in hkrati bakterija dražita sluznico in tako povzročata gastritis. Razjede ne povzroča bakterija sama, ampak vnetni odziv nanjo (<http://www.safewater.org>).

Preden bakterija naseli sluznico želodca gre skozi serijo korakov oziroma uporabi več patogenih mehanizmov (Slika 1):

- Pritrjevanje – *H. pylori* vstopi in se pritrdi v notranjosti želodca, da vzpostavi okolje v katerem uspešno raste.
- Proizvodnja toksina – bakterija proizvaja toksične substance, s katerimi poveča izločanje vode in elektrolitov v želodec. S tem povzroča smrt celic epitelijskega želodca in si omogoči prevzem okolja ter zmanjša tekmovanje za potrebna hranila.
- Celična invazija – bakterija vstopi v epitelijske celice, da se zaščiti. Potem uniči gostiteljsko celico in se preseli v naslednjo. Proces se nadaljuje in vodi do nastanka poškodovanega tkiva, ki se kaže kot razjeda.
- Izguba mikrovilov – substance, ki jih bakterija izloči med invazijo celic, povzročajo spremembe v gostiteljski celici. Spremembe se kažejo kot rezultat slabše absorpcije, s čimer telo pridobi manj hranil.

Prenos okužbe še ni povsem poznan, vendar predvidevajo, da gre za oralni prenos. Najverjetnejša pot razširjanja je fekalno-oralno ali oralno-oralno. Prenos fekalno-oralno je mogoč z uživanjem kontaminirane hrane ali vode. Bakterija z okužene osebe lahko preide na hrano ali vodo neokužene osebe z nepravilnim ravnanjem. Pot prenosa oralno-oralno je možna le s poljubljanjem (<http://www.safewater.org>).

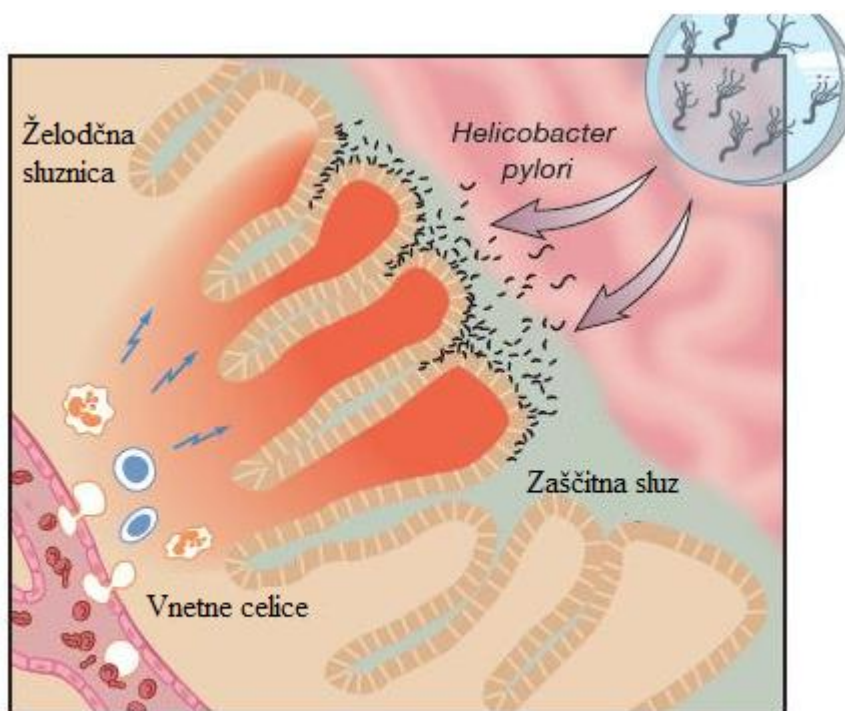
2.2.3.1 Kolonizacija želodca s *H. pylori*

H. pylori pri prvi kolonizaciji povzroča akutni površinski gastritis - infiltrat nevtrofilcev med površino in foveolarnimi celicami epitelijskega želodca. Površina epitelijskega želodca kaže degenerativne spremembe z izgubo sluznice in povečano luščenje. Sprva je prizadeta sluznica antruma, ob pomanjkanju kisline pa kasneje še sluznica korpusa. Po 11 do 14 dneh se poveča limfoplazmocitna infiltracija. Lamina propria je edematozna.

2.2.3.2 Kronična okužba s *H. pylori*

Zgodi se mononuklearna infiltracija, ki poteka foveolarno. Aktivna nevtrofilna infiltracija v regiji rasti sluznice želodca (vrat), intersticiumu in foveolarnem epiteliju. Nastanejo limfoidni agregati z zarodnimi centri. Kronični gastritis povzročen s *H. pylori* je prisoten predvsem v antrumu. Kronični gastritis s *H. pylori* je lahko multifokalni z multifokalno atrofijo in intestinalno metaplazijo, ki predstavljajo dolgoročne posledice. Po eradikaciji *H. pylori* nevtrofilci izginejo po 6 do 8 tednih. Kronična infiltracija v antralni regiji traja dlje (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).

Pomembno vprašanje je, ali po eradikaciji bakterije v bolnikih z atrofičnim gastritisom tako pade tveganje za razvoj raka želodca. Na Japonskem so izvedli prospektivno študijo, ki je pokazala, da eradikacija pri bolnikih z endoskopsko resekcijo zgodnje faze raka želodca zmanjša pojav novega zgodnjega raka. Pri kontrolni skupini ljudi brez eradikacije *H. pylori* pa se je pojavil intestinalni tip raka želodca. Torej, v kolikor je pri bolnikih z atrofičnim gastritisom prisoten *H. pylori*, je potrebna intervencija z eradikacijo bakterije, da se tako prepreči nastanek raka želodca (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).



Slika 1: Prikaz vnetja želodčne sluznice (gastritisa), ki ga povzroča *H. pylori* (Marshall in Warren, 2005: 1).

Vnetje velikokrat poteka asimptomatsko.

2.2.4 Bolezni, povezane z okužbo s *H. pylori*

Okužba s *H. pylori* je ena izmed najpogostejših kroničnih okužb na svetu, toda pri večini okuženih ne vodi do razvoja zapletov. Kljub temu pa majhen odstotek okuženih posameznikov razvije resna obolenja kot so peptične razjede, distalni rak želodca ali limfom od sluznice odvisnega limfoidnega tkiva (MALT). (Queiroz in sod., 2004).

H. pylori povzroča akutni gastritis, kronični gastritis, peptične razjede, rak želodca in limfom sluznično-limfoidnega tkiva (MALT) (Kodama in sod., 2005). Razlika v kliničnem izidu zaradi okužbe s *H. pylori* je rezultat interakcij med gostiteljem, okoljem in bakterijskimi virulentnimi dejavniki (Queiroz in sod., 2004; Manxhuka-Kerliu in sod., 2009): hiperplastični

polipi, limfocitni gastritis, anemija, bolezen peptičnih razjed, duodenitis, intestinalna metaplazija, dolgoročne posledice kroničnega gastritisa s *H. pylori* z intestinalno metaplazijo oziroma karcinom želodca (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).

Razjeda nastane, ko je prisotna razpoka v sluznični plasti želodca, kar omogoča kislini in prebavnim encimom prehod skozi in draženje želodčne mišice. *H. pylori* prispeva k nastanku razpoke s tem, da živi v sloju sluznice in tako poveča verjetnost za nastanek razjede (<http://www.safewater.org>).

2.2.5 Karcinogeneza želodca

Čeprav je okužba s *H. pylori* glavni dejavnik razvoja raka želodca, ga razvije le do 3 % vseh okuženih ljudi. Bakterija in ostali okoljski dejavniki le delno obrazložijo incidenco raka. Ugotovili so, da k razvoju raka botrujejo genetski polimorfizmi posameznega človeka (Kamangar in sod., 2006).

Vnetje je ključni korak procesa karcinogeneze pri raku želodca. Kronični gastritis predstavlja zgodnjo fazo napredovanja do intestinalnega tipa raka želodca. Posledično tako močnejši vnetni odziv gostitelja poveča tveganje za nastanek raka. To so potrdile tudi številne študije, kjer so ugotovili, da se tveganje za raka poveča s številom polimorfizmov v genih za vnetne citokine. Oseba s tremi vnetnimi polimorfizmi naj bi imela do 20-krat večjo verjetnost da razvije raka želodca. Nekatere študije pa so takšno hipotezo zavrnilo (Kamangar in sod., 2006).

H. pylori vpliva na celice epitelija želodca in tako aktivira signalne poti za karcinogenezo. Metilacija E-kadherina je eden izmed prvih procesov, ki jih sproži okužba s *H. pylori*. Bakterija povzroči hiperproliferacijo epitelija želodca. To je stanje, ki poveča tveganje za nakopičenje mutacij in neoplastičnih transformacij. Infiltrirajoči nevtrofilci *H. pylori* gastritisa

sprostijo različne vnetne mediatorje in toksične oksidante, ki delujejo mutageno. Intestinalna metaplazija je stanje, ki predisponira oziroma vodi do karcinoma. Spremembe v genih (nestabilnost mikrosatelitov, izguba heterozigotnosti, mutacije v *p53*) prisotne pri karcinomu so našli pri intestinalni metaplaziji, ki kaže potencialni razvoj k malignosti (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).

2.2.6 Eradikacija bakterije

Okužbo zdravimo z antibiotiki. Terapija traja 10 do 14 dni z uporabo enega ali dveh učinkovitih antibiotikov (amoksicilin, tetraciklin, metronidazol, klaritromicin). Terapija z enim antibiotikom ni vedno učinkovita, zato se uporablja kombinacija vsaj dveh ali treh različnih antibiotikov. Prva linija zdravljenja tako še vedno ostaja klaritromicin, amoksicilin ali metronidazol v povezavi z inhibitorjem protonske črpalke. Inhibitor protonske črpalke zavre izločanje želodčne kisline in blaži simptome, pomiri vnetje sluznice in celo poveča učinkovitost delovanja antibiotikov proti okužbi s *H. pylori*. Vedno več študij nakazuje na slabšo eradikacijo bakterije s potekajočim zdravljenjem. Tako se svetuje podaljšano zdravljenje, kar ni ravno vedno učinkovito. Zato se posega po sekvenčni terapiji, ki je učinkovita alternativa standardni trikratni terapiji pri že rezistentnih bakterijah (Egan in sod., 2007).

Kljub temu ostaja zdravljenje klinični problem, saj sta povečana protimikrobna rezistenca in s tem slabša eradikacija rezultat prevelike uporabe antibiotikov. Pri standardnem zdravljenju je eradikacija bakterije nižja od 80 % (Egan in sod., 2007).

2.3 SYDNEYSKA KLASIFIKACIJA GASTRITISOV

Sydneyski sistem klasifikacije in gradacije gastritisov so razvili leta 1990 na 9. svetovnem kongresu gastroenterologije v Sydneyu, leta 1994 pa so ga posodobili v Houstonu. Sistem

zajema pomembnost kombinacije topografskih, morfoloških in etioloških informacij za diagnostiko gastritisov (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009). Tako poveže topografske, morfološke in etiološke informacije v nekakšno shemo, ki omogoča produktivno in klinično uporabno diagnozo. Namen uveljavitve klasifikacije je bil a) vpeljati dogovorjeno terminologijo gastritisov, b) identificirati, definirati in poskusiti rešiti probleme s prejšnjo klasifikacijo po Sydneyskem sistemu. Poudarili so razlike med atrofičnim in neatrofičnim želodcem (Dixon in sod., 1996).

Na splošno klasificiramo gastritise na akutne in kronične. Kronični se nato delijo na (i) neatrofične kronične gastritise, ki jih povzročajo okužbe s *H. pylori*, (ii) atrofične gastritise, ki so avtoimunske in multifokalni atrofični gastritisi zaradi *H. pylori* oziroma prehranskih navad in (iii) posebnih gastritisov, ki nastanejo zaradi drugačnih dejavnikov (kemični, radiacijski, limfocitni, granulomatozni, eozinofilni, infektivni) (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).

Gastritis ima širok histopatološki in topografološki spekter ter predstavlja vzorec bolezni, ki je dobro prepoznan in ovrednoten. Patologi, ki bolezen prepoznajo po značilni morfologiji opazovanih lezij, zanje uporabljajo različna imena, kar vodi do skrajne zmedenosti, kljub istemu vzorcu bolezni (Dixon in sod., 1996).

Odkritje *H. pylori* je spremenilo koncept etiologije, ki je pokazalo, da je okužba z bakterijo eden poglavitnih vzrokov neavtoimunskega kroničnega gastritisa (Dixon in sod., 1996). Prisotnost *H. pylori* v bioptičnem vzorcu še ne pomeni, da je bakterija edini etiološki agens. Pri nekaterih primerih jih je več različnih. Prisotnosti bakterije pa se pripisuje poškodovanje tkiva in histološke znake kroničnega gastritisa (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).

Mesta odvzema vzorcev so pomembna za natančno določitev diagnoze. Po prenovljenem Sydneyskem sistemu je priporočljivo odvzeti pet bioptičnih vzorcev, vključno z incizuro – razjedo. Ocenjevanje stanja je vizualno. Določa se gostota *H. pylori* oziroma razširjenost

okužbe, akutno in kronično vnetje, intestinalno metaplazijo in atrofijo (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).

Za diagnozo se odvzame dva do pet bioptičnih vzorcev antralnega dela želodca z male in velike krivine, 2 cm stran od pilorija, pred in po terapijski eradikaciji *H. pylori*. Za natančno diagnozo atrofije želodca, se odvzame odščip s sredine antruma in sredine male ter velike krivine (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).

Bioptične vzorce se analizira za pridobitev histopatoloških značilnosti gastritisa. Upošteva se semikvantitativne metode po Sydneyski klasifikaciji, gostota *H. pylori*, infiltracija nevtrofilcev in mononuklearnih celic, intestinalna metaplazija in displazija (blaga, zmerna, izrazita). Manj pomembne histopatološke značilnosti se ne ocenjuje ampak samo navede, v kolikor so prisotne. Kolonizacija želodca s *H. pylori* se navede v primeru, ko je pregledana celotna površina želodca. Stopnja vnetne aktivnosti se meri s količino nevtrofilcev v kriptah sluznice želodca. Poškodbe epitelija se zazna glede na disorientacijo linije rasti epiteljskih celic. Stopnjo intestinalne metaplazije se določa glede na količino glandularnega tkiva, ki ga nadomesti intestinalni tip epitelija. Atrofija sluznice se definira kot izguba specializiranih žlez v sluznici želodca, ki jih deloma nadomesti intestinalni metaplastični epitelij. Gre za arhitekturne spremembe v prostornini in izgledu, kot so vejanje in medprostori med žlezami. Pri lamina proprii so vidni miofibroblasti in vnetne celice, ki reagirajo z žlezami in jih strukturno spremenijo, kar nato vodi do arhitekturnih, metaplastičnih, proliferacijskih in funkcionalnih sprememb. Displazijo ocenjujejo kot pomemben histološki faktor, ki vodi do razvoja raka (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).

Atrofija želodca se določi glede na spremembe v epiteliju in stromi na sluznici z delno ali kompletno izgubo glandularnega epitelija, ki vodi do arhitekturnih, metaplastičnih, proliferacijskih in funkcionalnih sprememb. Atrofični gastritis je rezultat dolgo trajajoče okužbe s *H. pylori*. Klinično pomembno je to, da predstavlja povečano tveganje za razvoj

karcinoma želodca. Prevalenca okužbe in gostota *H. pylori* se zmanjša sorazmerno z napredkom raka in atrofije sluznice (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).

Pregledovanje in zdravljenje okužbe s *H. pylori* ima potencial zmanjšati globalno smrtnost zaradi raka želodca. Prisotnost *H. pylori* poveča možnosti razvoja adenokarcinoma in limfoma MALT zato sta zgodnja detekcija in eradikacija *H. pylori* gastritisa izredno pomembna za preprečevanje nastanka kancerogenih sprememb in posledično raka.

Eradikacija in zdravljenje predvsem vplivata na nazadovanje limfoma MALT, medtem ko za adenokarcinom to še ni povsem znano. Izkoreninjenje bakterije pri visoko rizičnih bolnikih je potrebno za zagotavljanje ustreznega zdravljenja in preprečevanja raka želodca. Mesta odvzema bioptičnih vzorcev so pomembna za ustrezno diagnozo atrofije želodca. Štiri vzorce odvzamemo iz sredine antruma sredine manjše krivine in sredine antruma sredine velike krivine želodca.

Sydneyski sistem zagotavlja objektivno histološko ovrednotenje gastritisa s *H. pylori* in tako močno pripomore k oceni učinkovitosti zdravljenja (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009).

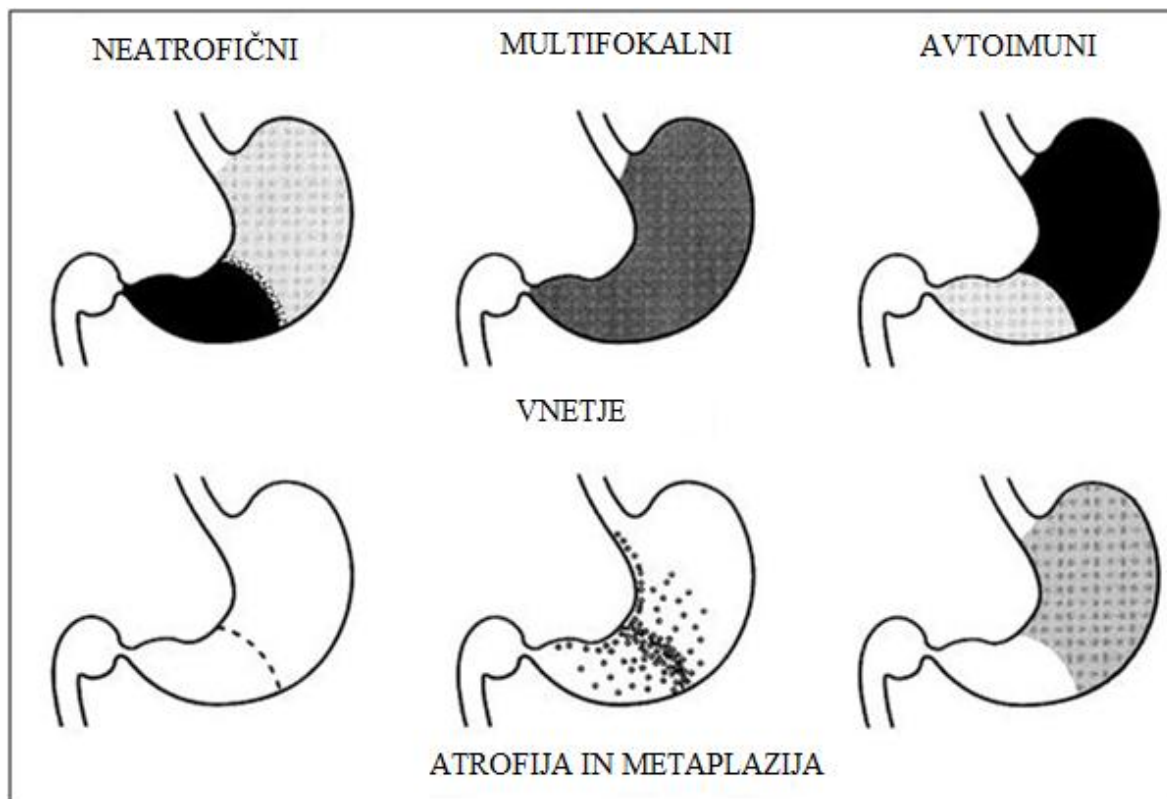
2.3.1 Klasifikacija

Terminologija sloni na patološkem vzorcu za gastritise. Imena so bila izbrana s strani gastrointestinalnih patologov. Spekter gastritisov zajema več patoloških skupin, ki jih lahko razvrstimo v tri kategorije: akutni, kronični in nedoločeni. Glavni namen je bil določiti kronični gastritis (Dixon in sod., 1996).

Nekateri vzročni agensi, kot je *H. pylori*, igrajo vlogo pri več kot le enem tipu gastritisov. Posameznik ima lahko več kot le en tip gastritisa, kar je rezultat izpostavljenosti različnim agensom. Primer je bolnik z okužbo z bakterijo *H. pylori*, ki povzroča kronični aktivni gastritis, hkrati pa ima bolnik še kemični gastritis, ki ga povzroča redno jemanje nesteroidnih protivnetnih zdravil. Tako je kljub temu, da je etiopatogeneza ključna in prepoznana pri večini

bolnikov, lahko patologi iz tega določijo le nespecifični tip in vzorec vnetja (Dixon in sod., 1996).

Pri neatrofičnem gastritisu, ki ga povzroča *H. pylori*, je vnetje predvsem antralno ali pa enotno razporejeno po antrumu in korpusu. Ni prisotne značilne atrofije. Pri atrofičnem gastritisu s *H. pylori* pa je vnetje ponavadi manjše in podobno v antrumu ter korpusu (Slika 2). Pojavijo se atrofična mesta z intestinalno metaplazijo na mestu incisura angularis, ki se lahko razširijo proksimalno in distalno ter oblikujejo zraščene zaplate atrofične metaplastične sluznice. Pri avtoimunskem gastritisu pa sta vnetje ter atrofija izključno prisotna samo v korpusu (Dixon in sod., 1996).

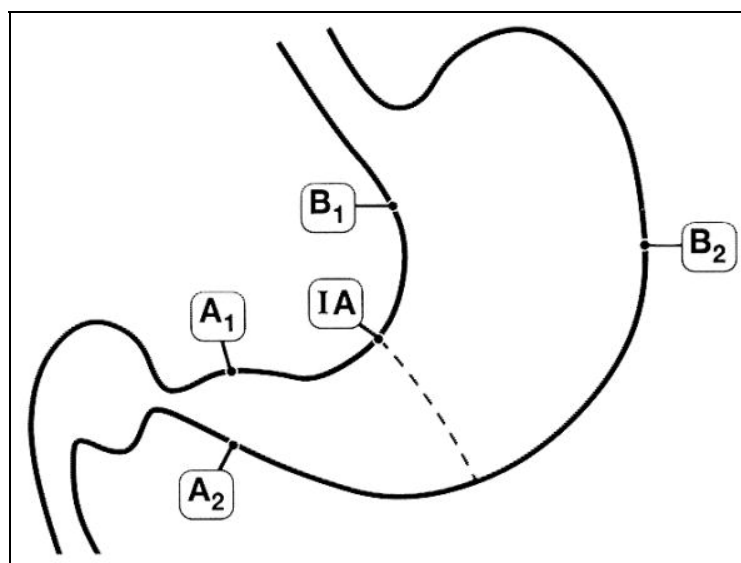


Slika 2: Shematski prikaz razporeditve vnetja in atrofije pri različnih tipih atrofičnega in neatrofičnega kroničnega gastritisa (Dixon in sod., 1996: 1164).

2.3.2 Praktični pristop

Mesta biopsije: Študije, pri katerih je bilo bolnikom, okuženim s *H. pylori*, odvzetih več bioptičnih vzorcev, potrjujejo da ima pregled štirih vzorcev (dva z antruma in dva s korpusa) višjo verjetnost določitve pravilnega statusa. Biopti korpusa so pomembni za pridobitev pozitivnih rezultatov po zdravljenju z inhibitorji protonskih črpalk, saj je to del želodca kjer se izloča želodčna kislina. Pod temi pogoji število bakterij upade oziroma le ta izgine iz antruma, toda ostane v sluznici, kjer pa se razvije cistična dilatacija (širjenje) s hipertrofijo parietalnih (stenskih) celic. Poleg tega so vzorci korpuralnega tkiva pomembni tudi za ovrednotenje vzorca gastritisa, ki nosi pomembno vlogo pri tveganju za podobne bolezni (Dixon in sod., 1996).

Ker sta bioptična vzorca antruma in korpusa skladna a zadostna, za ovrednotenje statusa *H. pylori* in razširjenosti gastritisa ter razširjenosti intestinalnih metaplazij in displazij, potrebujemo še dodatne bioptične vzorce lezij kjerkoli se nahajajo. Največjo stopnjo atrofije in intestinalne metaplazije se ponavadi najde na mestu incisura angularis, ki je tudi mesto za prepoznavo zgodnjih rakavih displazij. Tako vzorcem iz antruma in korpusa dodamo še peti ali nadaljnji vzorec biopsije z mesta incisura (Slika 3). Mesto odvzema dodatnega vzorca je odvisno od epidemioloških razmer tipov gastritisov in incidence karcinoma želodca (Dixon in sod., 1996).



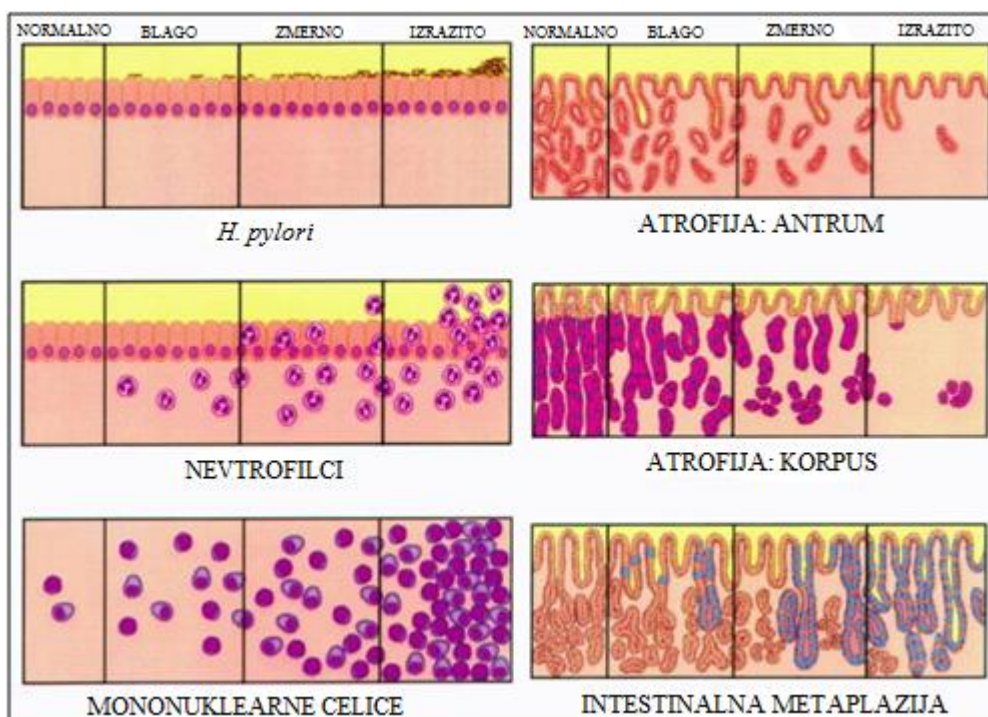
Slika 3: Shematski prikaz priporočljivih mest za biopsijo.

En vzorec se odvzame na majhni (A1) in en na veliki krivini (A2) antruma, 2 do 3 cm stran od pilorusa. Tretji vzorec z majhne krivine korpusa približno 4 cm proksimalno od angulusa (B1); nato s sredine velike krivine korpusa, približno 8 cm od kardijskega dela (B2); zadnji vzorec z mesta incisura angularis (IA) (Dixon in sod., 1996: 1164).

V laboratoriju se mora ločiti bioptične vzorce odvzetih s treh različnih mest. Priporočljivo je tudi posredovanje informacij o bolnikovi endoskopiji, klinični zgodovini in mestih biopsije (Dixon in sod., 1996).

2.3.3 Ovrednotenje morfoloških spremenljivk

Klasifikacija kroničnega gastritisa temelji na povezavi vzorca vnetja in atrofije z boleznijo. V nekaterih primerih so ti podatki dovolj za napoved peptične razjede ali tveganje raka želodca. Za prevod histopatološkega opazovanja v nek topografski vzorec oziroma za medsebojno primerjavo, se jih ovrednoti (Slika 4). Uporabljajo se izrazi blag, zmeren, izrazit (Dixon in sod., 1996).



Slika 4: Shema vizualnega ovrednotenja morfoloških spremenljivk na sluznici želodca (Dixon in sod., 1996: 1165).

2.3.3.1 Gostota *H. pylori*

Klinično pomembno je vedeti ali je bakterija prisotna. Razlike v gostoti bakterije imajo različen vpliv na razvoj ter povezavo z boleznijo in so epidemiološko pomembne. Ta je težko določljiva pri vzorcih z intestinalno metaplazijo, kjer ponavadi ni prisotne bakterije. Gostota se določa samo na epiteliju stene želodca, ignorira pa se sosednja metaplastična mesta (Dixon in sod., 1996).

2.3.3.2 Aktivnost polimorfonuklearnih nevtrofilcev

Meri se prisotnost nevtrofilcev pri kroničnem vnetju. Njihova aktivnost predstavlja merilo za kontinuirano akutno vnetje in poškodbe tkiva. Kronično vnetje brez nevtrofilcev je prav tako aktivno v pomenu besede, saj citotoksični T-limfociti in ostali celični efektorji igrajo vlogo pri

poškodbi tkiva in uničenju sluznice. Aktivnost nevtrofilcev je univerzalni fenomen pri gastritisih s *H. pylori*. Bioptični vzorci antrumov in korpusov vsebujejo nevtrofilce skorajda v vseh primerih ljudi okuženih s *H. pylori*. Vidi se jih v lamini proprii v epiteliju in v foveolarnem lumnu, kjer tvorijo globoke abscese. Gostota intraepitelijskih celic je odvisna od poškodbe sluznice in intenzitete okužbe s *H. pylori*. Nevtrofilci predstavljajo tako nekakšen indikator prisotnosti *H. pylori* in nato izginejo po nekaj dneh zdravljenja (Dixon in sod., 1996).

2.3.3.3 Kronično vnetje

Normalna sluznica želodca vsebuje le nekaj kroničnih vnetnih celic imenovanih mononuklearne celice oziroma levkociti v lamini proprii. Povečana količina kaže na kronični gastritis. Pri okužbi s *H. pylori* celični infiltrat vsebuje efektorje imunskega odziva, kot so CD4⁺ in CD8⁺ limfocite T, limfocite B, plazma celice, monocite, mast celice in eozinofilce. Pri normalni sluznici naj bi bilo število limfocitov v lamina proprii od 2 do 5, čim pa so prisotne plazma celice, že lahko govorimo o indikaciji na kronični vnetni odziv. Po eradikaciji bakterije nivo kroničnih vnetih celic počasi pada na normalno raven (Dixon in sod., 1996).

2.3.3.4 Atrofija sluznice

Atrofija je definirana kot izguba glandularnega (sluzničnega) tkiva. Vodi do tanjšanja sluznice in je imenovalec pri vseh patoloških procesih, ki povzročajo poškodbe sluznice. Izgubi žlez ali dolgem vnetju nato sledi erozija oziroma razjeda sluznice s poškodbami sloja ali posameznih mest sloja (Dixon in sod., 1996).

2.3.3.5 Intestinalna metaplazija

Intestinalna metaplazija je pogosta pri vseh kroničnih gastritisih. Prevalenca se poveča s trajanjem okužbe. Metaplastični epitelij se prepozna po celicah v obliki čaše, absorptivnih celicah, celicah podobnim kolonocitom in celicam s sluzjo. Metaplazijo se kategorizira na podlagi morfologije in encimske histokemije v metaplazijo tankega in metaplazijo debelega

črevesa oziroma po histokemiji sluzi v tri tipe (I, II, III), odvisno kakšno sluz (sialomucin, sulfomucin) vsebujejo določene celice (Dixon in sod., 1996).

Intestinalna metaplazija je splošno znana kot predstopnja, ki vodi k malignosti. Metaplazija tipa I ima najmanjšo tendenco za razvoj raka, medtem ko ima metaplazija tipa III največje tveganje za karcinom (Dixon in sod., 1996).

2.3.3.6 Topografija kroničnega gastritisa

Večina ljudi, ki dobi kronični aktivni gastritis zaradi okužbe s *H. pylori*, razvije izrazitejši gastritis v antrumu kot korpusu. V odsotnosti atrofije in intestinalne metaplazije, milejši difuzni kronični gastritis obeh predelov želodca ne razvije konkretnih kliničnih simptomov bolezni. Manjšina okuženih oseb razvije izrazito kronično vnetje v antrumu z milejšim vnetjem v oksintični sluznici. Gre za antralno-prevladujoči gastritis. Nekateri izmed teh pa razvijejo razjedo dvanajstnika. Redko okuženi s *H. pylori* kažejo korpus prevladujoči vzorec, ki pa sovпада z avtoimunskim gastritisom, saj se parietalne celice, ki izločajo kislino, nahajajo v korpusu želodca kjer bakterija zaradi kisline ne preživi. Vnetje, ki je omejeno na oksintično sluznico pri *H. pylori* negativnih bolnikih z difuzno glandularno atrofijo v korpusu, je bolj značilno za avtoimunske gastritis. Korpus značilno vnetje se ponavadi najde tudi pri limfocitnem gastritisu (Dixon in sod., 1996).

Atrofija in intestinalna metaplazija sta lahko difuzni ali multifokalni. Multifokalni atrofični gastritis je večinoma v povezavi z razjedami želodca in pri nekaterih s tveganjem za razvoj karcinoma želodca. Medtem, ko sta difuzni kronični gastritis in multifokalna atrofija velikokrat v povezavi z okužbo s *H. pylori*. Atrofija se lahko razvije tudi zaradi drugačnih dejavnikov, kot so refluks žolča, dietna poškodba, nesteroidna protivnetna zdravila. Dejavniki lahko delujejo posamezno ali simultano s *H. pylori*, kar nato povzroči razvoj multifokalne atrofije (Dixon in sod., 1996).

2.3.3.7 Etiologija

H. pylori je večinoma eden izmed vzrokov za razvoj gastritisa. V kolikor je bakterija dokazana histološko, se to poda v diagnozi. Težave nastopijo takrat, ko iz bioptičnih vzorcev s kroničnim vnetjem ni možno dokazati okužbe, vendar pa je bila ta potrjena pri prejšnjih odvzetih vzorcih istega bolnika oziroma je dokazana prisotnost bakterije z drugimi testi. Potrditev *H. pylori* ni edini vzročni faktor. Pogosto so prisotni še gostiteljevi (imunski odziv, krvna skupina...) ali okoljski kofaktorji (prehrana) (Dixon in sod., 1996).

Definicija avtoimunskega gastritisa ni možna samo na podlagi histološkega pregleda, saj so znaki podobni pozni fazi gastritisa s *H. pylori* in bioptičnim vzorcem korpusa pri bolnikih z multifokalnim kroničnim gastritisom. Lahko pa nam histologija pomaga pri namigu na avtoimunski gastritis, če ima bolnik korpus predominantni atrofični gastritis in ni prisotne atrofije ter metaplazije v antrumu (Dixon in sod., 1996).

2.3.3.8 Akutni gastritis

Znanih je več vrst kategorij akutnih gastritisov. Najpogostejša sta akutni hemoragični ali erozivni gastritis in akutni *Helicobacter* gastritis. Tretja varianta je gnojni gastritis, ki je izredno redek ter se ga večinoma prepozna pri avtopsih (Dixon in sod., 1996).

Akutni gastritis povzroča več dejavnikov; alkohol, aspirin, kortizon, fenilbutazon, protivnetna zdravila. Ti poškodujejo sluznico želodca. Pogosta povzročitelja sta tudi stres in šok. Podobna klinična slika se tako kaže pri bolnikih po hudi travmi, operacijah, septičnih bolnikih... Pogosta oblika pri teh osebah je hemoragični oziroma erozivni gastritis (Dixon in sod., 1996).

Akutna faza okužbe s *H. pylori* je redko vidna v samem bioptičnem vzorcu želodca, saj ima bolezen blage simptome. To fazo lahko dokažemo s serološkimi metodami, sam bioptični vzorec pa pokaže degenerativne spremembe površine epitelija, izločanje sluzi, luščenje celic. Sluzni gastritis je akutno gnojno stanje želodca pri katerem se piogeni organizmi difuzno

razširijo pod sluznico po celotnem organu. Tvorijo se stenski abscesi, sluznica se zaradi nakopičenja gnoja in edemov odebeli, vendar ostane nepoškodovana, ni prisotnih ulkusov (Dixon in sod., 1996).

Poznamo več različnih tipov gastritisov: kemični oziroma reaktivni, limfocitni, granulomatozni, eozinofilni, kolageni, radiacijski, infektivni (bakterijski, virusni, glivni, parazitski) (Dixon in sod., 1996).

2.4 EPIDEMIOLOGIJA RAKA ŽELODCA

Po zadnjih objavljenih podatkih je rak želodca v svetovnem merilu četrti najpogostejši rak za rakom pljuč, dojke in kolorektuma. Po umrljivosti zaradi raka je rak želodca na drugem mestu samo za rakom pljuč. Letno zbolijo na svetu za rakom želodca okoli 1.000.000 ljudi, umre jih 700.000. To število se bo kljub trendu nižanja incidence raka želodca, ki ga opažamo v zadnjih letih, v prihodnosti zaradi staranja in rasti svetovne populacije še povečevalo (Tepeš in Kavalarič, 2010; Chandanos in Lagergren, 2008). V Sloveniji je rak želodca po pogostosti na šestem mestu, po umrljivosti pa na četrtem mestu med vsemi raki. Bolezen se začne pojavljati po 40. letu in je najpogostejša med 60. in 80. letom starosti (Tepeš in Kavalarič, 2010; Gandos in sod. 2008).

Rak želodca je dvakrat pogostejši v moški populaciji. Natančnejši vzrok za to ni poznan, določeno vlogo pri tem pripisujejo varovalnemu učinku ženskih spolnih hormonov (Chandanos in Lagergren, 2008). Geografsko je rak želodca neenakomerno porazdeljen. Območja z visokim tveganjem (starostno standardizirana incidenčna stopnja pri moških >20/100.000 prebivalcev) so Japonska, Kitajska, vzhodna Evropa, Baltske države in nekatera področja Južne Amerike. Območja z nizkim tveganjem (starostno standardizirana incidenčna stopnja pri moških <10/100.000 prebivalcev) so Severna Amerika, južna Azija, večina Afrike, Avstralija, Nova Zelandija in nekatere države zahodne Evrope (Kamangar in sod., 2006;

Camargo in sod., 2006). Med nekaterimi področji z visokim in nizkim tveganjem je razlika v incidenci lahko tudi 15 do 20-krat. Slovenija je v območju z visokim tveganjem, saj njena starostno standardizirana incidenčna stopnja pri moških v zadnjih letih znaša 30/100.000 prebivalcev, kar je med najvišjimi vrednostmi v Evropi (Tepeš in Kavalar, 2010; Gandos in sod. 2008).

Histološko je več kot 90 % raka želodca adenokarcinomov. Preostalih 10 % predstavljajo ne-Hodgkinov limfom, gastrointestinalni stromalni tumor (GIST) in leiomiosarkom (Tepeš in Kavalar, 2010). Finski patolog Lauren je želodčne adenokarcinome histopatološko razdelil v dve osnovni kategoriji: intestinalni tip, za katerega je značilna kohezivna rast in tvorba žleznih struktur z različno stopnjo diferenciacije in difuzni tip brez kohezivne rašče, pri katerem posamezne rakaste celice postopoma infiltrirajo in odebelijo steno želodca. Intestinalni tip je dvakrat pogostejši pri moških, v povprečju za njim zbolijo starejši ljudje in ima boljše prognozo od difuznega tipa. Pogosto je ulceriran in največkrat nastane v distalnem delu želodca, v antrumu in na mali krivini. Nastane po dolgotrajnem procesu kroničnega vnetja želodčne sluznice, preko atrofije, intestinalne metaplazije in displazije (Dixon in sod., 1996). Difuzni tip je pogostejši pri mlajših in ima slabšo prognozo. Lahko se nahaja kjerkoli v želodcu, pogosto pa kar difuzno po celotni želodčni steni, zaradi česar ta izgubi svojo prožnost in jo imenujemo tudi »linitis plastica«. V območjih z visokim tveganje prevladuje predvsem intestinalni tip, medtem ko je difuzni tip bolj pogost v predelih z nizkim tveganjem. V svetu upada predvsem incidenca intestinalnega tipa želodčnega raka, kar povezujemo s sočasnim padcem prevalence okužbe s *H. pylori* in delno z izboljševanjem življenjskih razmer (Gold in sod., 2001).

Med glavne dejavnike tveganja za nastanek raka želodca štejemo okužbo z bakterijo *H. pylori*. Z njo se najpogosteje okužimo v rani mladosti, okužba pa traja vse življenje. Ker okužba večinoma poteka povsem asimptomatsko, mnogi opisujejo odnos bakterije in gostitelja kot komenzalizem (Amieva in sod., 2008). Okužbo s *H. pylori* so že kmalu po njenem odkritju

začeli povezovati z rakom želodca. Odločitev je v veliki meri temeljila na epidemioloških študijah s katerimi so dokazali povezanost prevalence okužbe in incidence oziroma umrljivosti zaradi raka želodca. V prvih meta analizah so ugotavljali, da okužba s *H. pylori* poveča tveganje za nastanek distalnega raka želodca 2 do 3-krat (Xue in sod., 2010; Kamangar in sod., 2006; Camargo in sod., 2006). V vseh so upoštevali tako prospektivno, kakor tudi retrospektivno zasnovane študije primerov in kontrol. Predvsem pri retrospektivni zasnovi študij obstaja metodološki problem, ki temelji na znanem dejstvu, da *H. pylori* ne kolonizira atrofične sluznice. Osebe z dolgotrajno atrofijo torej niso več kolonizirane z bakterijo. Z izgubo okužbe pa nivo protiteles v krvi postopoma upada (Dixon in sod., 1996). Bolniki z rakom želodca so tako lahko v času diagnoze raka seronegativni, bakterije ni prisotne v želodcu, čeprav so v preteklosti bili okuženi z bakterijo (Stolte in Meining, 2001). Študije, ki upoštevajo samo rezultate serologije v času diagnostike raka, zaradi tega podcenijo dejansko prevalenco v skupini primerov in s tem pomen okužbe pri nastanku raka. V kasnejši meta analizi, v kateri so upoštevali samo študije s prospektivno zasnovano, ugotavljajo, da je v podskupini primerov, ki so bili seropozitivni 10 in več let pred diagnozo želodčnega raka, takšno tveganje približno 6-krat večje, kot v skupini neokuženih kontrol. Ob upoštevanju takšnega relativnega tveganja in ob upoštevanju, da je prevalenca okužbe v razvitem svetu 35 % in nerazvitem svetu 85 %, lahko okužbi s *H. pylori* pripišemo med 65 in 80 % vseh distalnih rakov želodca (Helicobacter and Cancer Collaborative Group, 2001). To je tudi delež raka, ki bi ga ob ustreznem nadzoru okužbe lahko preprečili.

2.5 *H. pylori* IN VNETJE

Vsi sevi *H. pylori* povzročajo kronični aktivni gastritis z vnetjem sluznice pri katerem je prisotna infiltracija makrofagov, limfocitov B in T, polimorfonuklearnih celic in plazma celic. *H. pylori* sproži in ohranja vnetje sluznice želodca z različnimi mehanizmi, ki so lahko nekateri prisotni pri vseh sevih, nekateri pa le pri določenih sevih. Pri od seva neodvisnih mehanizmih so glavni sprožilci vnetja topni proteini Hp-NAP, ki aktivirajo

polimorfonuklearne in mononuklearne celice ter ureazo, ki sproži izločanje IL-8 iz epitelijskih celic želodčne sluznice. Število infiltrirajočih polimorfonuklearnih celic je odvisno od virulence inficirajočega seva. Slednje je večje pri okužbi s *cagA* pozitivnimi sevi. Kljub temu pa glavni sprožilec infiltracije polimorfonuklearnih celic ni *cagA*, ampak s *cagA* povezan *oipA* (Zambon in sod., 2005).

Infiltrirajoče vnetne celice pri okužbi sluznice želodca s *H. pylori* ne delujejo kot nereaktivni elementi, ampak s svojim delovanjem skušajo pozdraviti okužbo. Njihovo aktivacijo lahko ovrednotimo s proizvodnjo vnetnih citokinov. Pri okuženih bolnikih so zaznali visoko količino mononuklearnih (IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) in limfocitnih citokinov (IL-2, IL-2R). Ugotovili so, da podrazred limfocitov T, to so T celice pomagalke 3, lahko vplivajo na izid okužbe s *H. pylori* z zmanjšanjem vnetja s proizvodnjo IL-10 (Zambon in sod., 2005).

H. pylori je po Gramu negativna bakterija, ki igra etiološko vlogo pri razvoju gastritisa, peptične razjede in adenokarcinoma želodca. Pri patogenezi bolezni igra ključno vlogo več različnih bakterijskih dejavnikov. Sevi *H. pylori* tipa I vsebujejo otoke patogenosti, ki nosijo številne virulentne dejavnike, med drugim tudi *cagA* in *cagE*, in tako vplivajo na bolj resen potek bolezni. Študije kjer so uporabljali izogene mutante so pokazale, da so določeni geni v Cag-PAI, predvsem *cagE*, odgovorni za aktivacijo jedrskega dejavnika- κ B (NF- κ B) in posledično transkripcijo številnih vnetnih genov (IL-8, IL-1 β , INF- γ , TNF- α). Aktivacija receptorjev prirojenega imunskega odziva na okužbo pa še ni povsem poznana (Su in sod., 2003).

Ključni patofiziološki dogodek pri okužbi je razvoj vnetnega odziva. Bakterija ali njeni produkti sprožijo proces vnetja, kjer so glavni igralci citokini. Sproži se kaskada reakcij, kjer je glavni citokin IL-1 β . Ta inducira ekspresijo ostalih genov za TNF- β , IL-2, IL-6 in IL-12. Količina proizvedenih citokinov je odvisna od polimorfizmov genov. Pri okužbi s *H. pylori* se najprej sintetizira IL-1 β , nato pa še TNF- α . Cilj teh izločanj je obramba pred *H. pylori*. Oba

zavirata izločanje kisline želodca in povzročata hipoklorhidrijo v korpusu želodca. To omogoči bakteriji, da naseli širšo nišo, kar nato vodi do gastritisa, ki spodbudi razvoj atrofije želodca. Atrofija je prekurzor razvoja raka. Polimorfizmi genov za vnetne citokine vplivajo na razvoj hude patologije želodca in raka želodca v kavkazijski populaciji (Moorchung in sod., 2007).

Za atrofijo je potrebna avtoimunost proti parientalnim celicam, ki prekrije klasični avtoimuni gastritis s prisotnostjo različnih avtoprotiteles pri skoraj 40 % okuženih s *H. pylori*. Samo manjšina okuženih bolnikov z bakterijo razvije raka želodca, iz česar sklepajo, da je gostiteljevo genetsko ozadje ključnega pomena (Glas in sod., 2004).

2.6 GENSKI SKLOP ZA IL-1

Okužba s *H. pylori* vodi do različnih kliničnih izidov bolezni od asiptomatkega poteka pa do razvoja raka želodca. Resnost gastritisa je odvisna od virulentnih dejavnikov bakterije in gostiteljeve genetske predispozicije. Pri gostiteljevih dejavnikih gre predvsem za gene citokinov, ki vplivajo na patologijo gastritisa. Izločanje citokinov je odvisno od polimorfizmov teh genov. Genski polimorfizmi so normalne variante v človeškem genomu. Gre za prisotnost dveh ali več različnih alelov enega gena v populaciji. Zaporedje DNA človeka je razkrilo ogromno število genov, ki so polimorfni. V kodirajočih ali nekodirajočih regijah specifičnih genov so lahko prisotne substitucije – zamenjave enega baznega para ali pa spremenljivo število tandemskih ponovitev (VNTR – angl. Variable Number of Tandem Repeats) kratkih ponavljajočih se regij DNA. Takšne variacije oziroma polimorfizmi lahko vplivajo na stopnjo transkripcije gena, stabilnost mRNA ali količino in aktivnost specifičnega proteina (Moorchung in sod., 2007). Polimorfizem posameznih nukleotidov – SNP (angl. Single Nucleotide Polymorphism) je označevalec na točno določenem mestu DNA, ki nastane zaradi zamenjave enega nukleotida z drugim (npr. A \rightarrow C) in predstavlja variacijo v genetskem zapisu, ki se razlikuje med ljudmi. Poznamo dva tipa zamenjav enega nukleotida;

tranzicije kjer gre za zamenjavo dveh purinov (A, G) oziroma dveh pirimidinov (C, T) in transverzije kjer se zamenja purin s pirimidinom ali obratno. Omenjene zamenjave se odražajo v fenotipskih razlikah (boleznih, lastnostih) med posameznimi ljudmi. Polimorfizmi se lahko nahajajo znotraj kodirajočih, nekodirajočih regij genov ali v medgenskih regijah. SNP-ji v kodirajoči regiji večinoma ne spremenijo aminokislinskega zaporedja proteina zaradi degeneriranosti genskega koda – sinonimna substitucija oziroma tiha mutacija. V kolikor je spremenjeno zaporedje aminokislin pa govorimo o nesinonimnih zamenjavah, ki so »missense« ob zamenjavi druge aminokislinske ali »nonsense« mutacije, ko se ustvari stop kodon in prepreči nadaljnje prevajanje zaporedja. SNP-ji v regulatornih regijah lahko spremenijo izražanje gena in proizvodnje določenega proteina, vendar jih je težko določiti (Smith, 2002).

Okužba s *H. pylori* in s citokini spodbujen vnetni odziv igrata pomembno vlogo pri patogenezi raka želodca. Rak želodca je drugi najpogostejši razlog smrti zaradi raka na svetu. Perzistentno vnetje, ki ga povzroči okužba z bakterijo sproži hipoklorhidrijo in atrofijo želodca, ki sta zgodnja prekurzorja razvoja raka želodca. Čeprav je prevalenca okužbe s *H. pylori* med 40 in 80 %, le majhen delež okuženih razvije rak želodca. Genetske variacije v genih za citokine in njihovih receptorjih, ki določajo intenzivnost vnetnega odziva, lahko prispevajo k izidu okužbe in razvoju želodčnih lezij. Študije v kavkazijski populaciji so pokazale, da sta polimorfizma *IL-1B* za IL-1 β in *IL-1RN* za IL-1ra, ki povečata sintezo IL-1 β , povezana s hipoklorhidrijo zaradi *H. pylori* in nastankom raka želodca. Medtem so študije v japonski, kitajski in tajvanski populaciji zavrnilo mogočo povezavo, saj se frekvence genotipov že v kontrolni populaciji razlikujejo v primerjavi s kavkazijsko (Lu in sod., 2005).

Okužba s *H. pylori*, kajenje in nizek nivo vitamina C v prehrani so okoljski dejavniki tveganja za rak želodca. Čeprav je pitje alkohola znan dejavnik tveganja za razvoj raka zgornjega respiratornega in prebavnega trakta, so dokazi za razvoj raka želodca slabi. Toda študije so

pokazale, da kajenje in pitje alkohola lahko vplivata na proizvodnjo citokinov. Posledično lahko delujeta na genotipe genov za citokine, ki povečajo vnetje v želodcu (Lu in sod., 2005).

Čeprav so prisotne razlike v sevih bakterije, le te niso zadosti, da določajo specifičen izid bolezni. Pomembni so dejavniki gostitelja, kot so genetika, starost, spol, ki lahko vplivajo na imunski in vnetni odziv na okužbo, ki nato sama prispeva k razvoju bolezni. Med genetskimi dejavniki so pomembni polimorfizmi v promotorskih regijah genov za citokine, ki vplivajo na samo transkripcijo in tako predstavljajo kandidate za gostiteljeve dejavnike tveganja. Med njimi sta najpomembnejša gena za vnetna citokina IL-1 β in TNF- α , saj okužba s *H. pylori* spodbudi izražanje le teh. Dva genotipa genov *IL-1B* in *IL-1RN* sta v povezavi s povečanim tveganjem za hipoklorhidrijo, resne lezije želodca in razvoj raka želodca v kavkazijski in azijski populaciji. Nosilci polimorfnege alela C namesto T na mestu -31 regulatorne regije gena *IL-1B* kažejo povečano izražanje gena za IL-1 β pri okužbi s *H. pylori*, ki poveča vnetje in lezije želodca. IL-1 β je močan inhibitor želodčne kisline, tako da povečana koncentracija IL-1 β lahko povzroči hipoklorhidrijo. Gen *IL-1RN* ima številne VNTR v intronu 2, ki predstavljajo kratke alele le z dvema ponovitvama (*IL-1RN*2*) oziroma dolge alele s 3 do 6 ponovitvami (*IL-1RN*1*). *IL-1RN*2* je hkrati povezan s povečano proizvodnjo IL-1 β , resnimi lezijami želodca in povečanim tveganjem za razvoj raka želodca (Rocha in sod., 2005).

Genski sklop za interlevkin-1 (IL-1) se nahaja v kromosomu 2q in vsebuje zapis za 3 gene, *IL-1A*, *IL-1B* in *IL-1RN*, ki nosijo zapis za vnetne citokine IL-1 α , IL-1 β in receptorski antagonist IL-1ra. Ob okužbi s *H. pylori* se izločanje IL-1 β v želodčni sluznici poveča. Za nastanek želodčnega raka je pomembno predvsem njegovo vnetno delovanje in močna inhibicija izločanja želodčne kisline. Je 100-krat močnejši zaviralec izločanja HCl kot inhibitorji protonske črpalke in 6000-krat močnejši od antagonistov H2. V genu *IL-1B* so opazovali 3 dvoalelne polimorfizme na mestih -31, -511 in +3954 od začetnega mesta transkripcije. Pri vseh treh gre za spremembo enega nukleotida C v T (El-Omar in sod., 2000). Gre za tranzicijo baz C>T na mestu -511 in +3954 ter tranzicijo T>C na mestu -31 (Xue in sod., 2010).

Ugotovili so skoraj popolno vezano dedovanje (linkage disequilibrium) med alelnimi mesti *IL-1B* -31 in -511. To sestoji bodisi iz haplotipa C/T ali T/C. Nosilci alela s C na mestu *IL-1B* -31*C ali alela s T na mestu *IL-1B* -511*T izločajo manj želodčne kisline (hipoklorhidrija) v odgovor na okužbo s *H. pylori* (OR \approx 10). Funkcijsko gledano je polimorfizem gena *IL-1B* na mestu -31 od začetka transkripcije iz C v T polimorfizem zaporedja »TATA-box« in tako vpliva na interakcijo med DNA in proteini in posledično na prepisovanje gena za IL-1 β . Polimorfizem *IL-1B* na mestu -511 iz C v T nima jasne funkcionalne razlage. Zaradi vezave na polimorfizno mesto -31 si njegovo vlogo predstavljamo predvsem kot njegov označevalec (El-Omar in sod., 2000).

Gen za *IL-1RN* ima v intronu 2 lahko različno število ponavljajočih elementov (tandem repeat) dolgih 86 baznih parov (bp). Obstaja 5 različic alela in sicer: alel *1 = 4 ponovitve, alel *2 = 2 ponovitvi, alel *3 = 5 ponovitev, alel *4 = 3 ponovitve in alel *5 = 6 ponovitev. Alel 2 so povezovali z različnimi kroničnimi vnetnimi in avtoimunskimi boleznimi. Polimorfizem *IL-1RN**2 je povezan z višjim izločanjem IL-1 β , najverjetneje preko zmanjšanja izločanja antagonista njegovega receptorja. Učinek haplotipa *IL-1RN**2 na izločanje želodčne kisline je viden samo pri homozigotih za ta lokus (*IL-1RN**2/2) in je nekoliko manjši, kot v primeru lokusa *IL-1B* -31*T (OR \approx 5) (El-Omar in sod., 2000).

Originalna ocena deleža želodčnih rakov, ki jih lahko pripisujemo skupnemu učinku polimorfnihi mest *IL-1B* -31*T in *IL-1RN* *2 je 38 %. Učinek samo prvega je večji, saj je viden že pri heterozigotih (31 %). Učinek drugega je nekoliko manjši, saj se izrazi samo pri homozigotih za lokus *IL-1RN* *2 (18 %) (El-Omar in sod., 2000).

2.6.1 IL-1 β

Poleg omenjenih bakterijskih virulentnih dejavnikov so za nastanek raka želodca zelo pomembni tudi gostiteljevi dejavniki. Dosedanje raziskave so se omejele na študij nekaterih

genov, katerih produkti igrajo ključno vlogo v imunskem odgovoru na okužbo. Tako so proučevali predvsem polimorfizme genov za nekatere vnetne citokine (Jorge in sod., 2010).

Znano je, da gen za IL-1 β igra pomembno vlogo pri genetski predispoziciji za razvoj raka želodca. Ni pa podatka za njegovo vlogo pri razvoju podtipov raka želodca (Sitarz in sod., 2008). Vemo samo, da naj bi bil genetski polimorfizem IL-1 100-krat močnejši zaviralec izločanja kisline kot inhibitor protonske črpalke (Ito in sod., 2007).

Interlevkin-1 beta (IL-1 β) je ključni vnetni citokin, ki regulira izražanje več genov vnetja. IL-1 β je endogeni inhibitor izločanja želodčne kisline in je pomemben pri indukciji in povečanju vnetnega odgovora na okužbo s *H. pylori*. Čeprav izločanje IL-1 β temelji na več dejavnikih, veliko dokazov nakazuje, da je pomembno predvsem genetsko ozadje. Tako so polimorfizmi posameznih nukleotidov v genu za IL-1 β pomembni pri aktivaciji transkripcije genov (Sitarz in sod., 2008).

Proučeni so različni SNP-i za IL-1 β , vendar je bilo veliko funkcijsko neučinkovitih in tako niso našli povezave med genetsko predispozicijo in razvojem raka. Našli pa so dva polimorfizma na mestu -31 in -511 v promotorski regiji gena, ki vplivata na razvoj raka. Znano je, da nosilci za alel IL-1 β -31 kažejo višjo plazemsko koncentracijo IL-1 β kot osebe z divjim genotipom. Povečano izločanje IL-1 β je povezano pri vplivu nastanka tumorjev invazivnosti, angiogeneze in metastaz ter se ga tako smatra kot negativni prognostični dejavnik. Povezave med razvojem želodčne razjede in polimorfizmom v mestu IL-1 β -31*T>C niso našli, saj pri teh bolnikih niso testirali genetske predispozicije (Sitarz in sod., 2008).

Vnetje je ključna komponenta skoraj vsake kronične bolezni. IL-1 β je sprožitveni gen, ki igra pomembno vlogo pri vnetju in kancerogenezi. Izražanje IL-1 β je odvisno od posameznikove občutljivosti, geografske lokacije in genetskih dejavnikov. Genetski polimorfizmi, ki

spremenijo koncentracijo IL-1 β , imajo močan vpliv na kancerogenezo. Alel IL-1 β -31 je povezan s povišanim tveganjem za razvoj raka želodca v populacijah na Poljskem, Škotskem in v Mehiki. Negativne rezultate pa so dobili na Finskem in v Braziliji. Tako sklepajo, da nimajo vse populacije na svetu genetske predispozicije za razvoj raka želodca v povezavi z vnetnim polimorfizmom v genu za IL-1. Rezultati so morebiti negativni, ker so bile za analizo izbrane izredno majhne populacije rakavih bolnikov. Razlog za različne rezultate je lahko vpliv raznolikih genetskih in okoljskih dejavnikov populacij, predvsem okužba s *H. pylori* (Sitarz in sod., 2008).

Znano je, da rak želodca in razjeda želodca nista v povezavi, saj imata različne genotipe v IL-1 β -31 in prihaja do različnega izločanja želodčne kisline. Tako so osebe, ki razvijejo peptično razjedo, zavarovane pred razvojem raka želodca. Posamezniki z razjedo predvidoma ne nosijo polimorfizma C v mestu IL-1 β -31. Lahko pa se manjšina populacije znajde v nevarnosti za razvoj raka želodca, saj polimorfizem C v mestu IL-1 β -31 poveča inhibicijo izločanja želodčne kisline in poveča tveganje za razvoj raka (Sitarz in sod., 2008).

Ključni element odziva na okužbo s *H. pylori* je takojšnja proizvodnja vnetnih citokinov v sluznici želodca, kot sta na primer IL-1 β in tumor nekrotizirajoči faktor α (TNF- α). IL-1 β je molekula, ki ščiti celice želodca in deluje antiulcerativno in antisekretorno. Močno zavira izločanje želodčne kisline in pepsinogena. Njegov antagonist, IL-1 receptorski antagonist (IL-1ra) ima sposobnost specifične inhibicije vnetne funkcije IL-1 s tem, da se veže na receptor IL-1 in blokira signalno transdukcijo (Garcia-Gonzales in sod., 2005).

2.6.2 IL-1ra

IL-1ra je član družine IL-1, ki vključuje klasične citokine IL-1 (α in β), IL-18 in na novo opisan IL-1F 5 do 11. IL-1ra deluje kot antagonist receptorja tipa I IL-1 (IL-1RI) in prepreči od IL-1 (α in β) odvisno signalizacijo. V odsotnosti IL-1ra aktivnost IL-1 ni preprečena in tako

sledi močno vnetje. IL-1 β se iz celic izloča v večjih koncentracijah in ga tako pogosto najdemo v serumu in sekrecijah. IL-1 β deluje sinergistično s TNF- α , aktivira vnetni odziv pri večini celic in promovira odziv akutne faze. Citokin igra pomembno vlogo pri regulaciji akutnega vnetnega odziva in je eden izmed prvih aktiviranih citokinov ob prisotnosti agensa v telesu. Aktivnost je uravnana predvsem z antagonističnim receptorjem IL-1ra, ki zavre aktivnost IL-1 s kompeticijo za njegov receptor. Vnetna aktivnost IL-1 β je tako odvisna od dejanskega deleža IL-1 β v primerjavi z deležem IL-1ra (Cauci in sod., 2010).

IL-1 β in njegov specifični naravni inhibitor receptorski antagonist IL-1ra sta citokina, ki igrata ključno vlogo pri uravnavanju izločanja želodčne kisline in imunskega odziva v sluznici gastrointestinalnega trakta (Garcia-Gonzales in sod., 2005). IL-1 β stimulira proizvodnjo prostaglandina in dušikovih oksidov, ki imajo močno vnetno delovanje. Hkrati inducira sintezo več kemokinov. IL-1 β je visoko aktivni pleiotropni citokin z različnimi funkcijami. Ima mnogo sistemskih vplivov pri zaščiti telesa med drugim tudi odziv na stres in metabolizem inzulina, lipidov in kosti. Glavni citokin ki nasprotuje delovanju IL-1 β je IL-1ra, ki je naravni inhibitor IL-1 β in se kompetitivno veže na njegove receptorje tipa I in prekine receptorski signal (Xue in sod., 2010; Cauci in sod., 2010). IL-1ra modulira poseben receptor IL-1 tipa II, ki deluje kot vaba za IL-1. Protein IL-1ra proizvaja veliko celic, ki lahko sintetizirajo IL-1 β , večinoma hepatocite, adipocite, nevtrofilci in makrofagi. Koncentracija IL-1ra v plazmi je koordinacijsko regulirana z genoma *IL-1RN* in *IL-1B*. Biološka funkcija IL-1ra še ni povsem poznana (Cauci in sod., 2010).

Ugotovili so, da so spremembe v funkciji IL-1 rezultat enega polimorfizma za določen haplotip. Domnevno je nemogoče govoriti o določenih alelih, ki naj bi vplivali na povečano ali zmanjšano sintezo, saj več polimorfizmov v regulatornih regijah posameznega gena vpliva na transkripcijo. Pri polimorfizmu VNTR v genu *IL-1RN* je alel 2 povezan s povečanjem proizvodnje IL-1ra v človeških monocitih, toda v epitelijskih celicah homozigotov so za ta alel

našli negativno povratno zanko, ki naj bi dva do trikrat zmanjšala proizvodnjo proteina IL-1ra v primerjavi z genotipom *1/1 (Gromadzka in Członkowska, 2010).

Več študij je pokazalo, da polimorfizma v genih za IL-1 β (*IL-1B*) in IL-1ra (*IL-1RN*) korelirata s spremenjeno ekspresijo proteinov *in vitro* in *in vivo*. Gena sta locirana blizu skupaj v človeškem kromosomu 2. Polimorfizmi gena za IL-1 so povezani z veliko kliničnimi stanji skupaj z vnetnimi in infekcijskimi boleznimi (periodontalne in arterijske bolezni, spremenjena metabolna stanja, diabetes tipa 2, komplikacije diabetesa tipa 2, rak želodca, revmatoidni artritis, ankilozirajoči spondilitis, sistematska vnetja, miopatije, Alzheimerjeva bolezen, malarija in bakterijska vaginoza) (Cauci in sod., 2010).

Pri polimorfizmu VNTR v intronu 2 *IL-1RN* gre za različno število tandemskih ponovitev dolžine 86 bp 5 različno dolgih alelov. Alel 1 ima 4 ponovitve po 86 bp in je dolg 410 bp, iskani alel 2 ima 2 ponovitvi in je dolg 240 bp, alel 3 nosi 5 ponovitev in je dolžine 500 bp, alel 4 ima 3 ponovitve (325 bp) in alel 5 ima 6 ponovitev ter je dolžine 595 bp. Za lažjo predstavbo so po Marchadu in sodelavcih alele razdelili na kratke S (alel 2) in dolge L alele (1, 3, 4 in 5) (Cauci in sod., 2010).

Rekombinantni IL-1ra se uporablja tudi pri ljudeh za protivnetno terapijo pri različnih stanjih kot so revmatične bolezni, ankilozirajoči spondilitis, kronična ahilova tendinopatija, sladkorna bolezen tipa 2 in sistemske vnetne bolezni (Cauci in sod., 2010).

2.6.3 Funkcija ključnih polimorfizmov v genu za IL-1

Skupina genov družine IL-1; *IL-1A*, *IL-1B* in *IL-1RN* se nahajajo v daljšem delu človeškega kromosoma 2 (2q13-14). Vsebuje 3 sorodne gene, ki kodirajo vnetne citokine IL-1 α , IL-1 β in endogeni antagonist IL-1ra v regiji veliki 430 kb. V literaturi je opisanih več različnih funkcionalnih polimorfizmov kot so polimorfizmi spremenljivega števila tandemskih

ponovitev (VNTR) dolgih 86 bp v intronu 2 *IL-1RN* in polimorfizmi treh bialelnih restrikcijskih fragmentov (RFLP) na mestu -511, -31 in +3954 gena za IL-1 β . Na Japonskem so Furuta in sodelavci (2002) dokazali, da nosi alel 2 gena *IL-1RN* informacijo za zaščitno vlogo proti duodenalni razjedi. Genotip IL-1 β -511*T/T se je manjkrat pojavil v populaciji z duodenalno razjedo kot v populaciji z okužbo s *H. pylori* in je imel zaščitno vlogo pri pojavu razjede pri bolnikih starejših od 60 let (Garcia-Gonzales in sod., 2005). Multivariantne analize so identificirale prenašalce IL-1 β +3954*T in alela za *IL-1RN*2* kot neodvisen dejavnik tveganja za duodenalno razjedo (Garcia-Gonzales in sod., 2001).

El-Omar in sodelavci (2003) so identificirali vnetni profil genetskih polimorfizmov pri genih za IL-1 β (prenašalci IL-1 β -511*T) in *IL-1RN* (*IL-1RN*2/2*) za povečanje tveganja za razvoj raka želodca. Marchado in sodelavci (2003) so pri Portugalski populaciji poleg zgornjih dveh potrdili tudi polimorfizem pri genu za TNF- α . Povezava med tremi polimorfizmi naj bi izredno povečala tendenco za razvoj atrofičnega gastritisa in raka želodca (Garcia-Gonzales in sod., 2005). El-Omar je s sodelavci (2003) odkril, da imajo posamezniki z genotipom -31*T/T ali C/T povečano ekspresijo gena za IL-1 β pri odzivu na vnetje in nizko vrednost pH v želodcu. Vrednost pH kisline v želodcu je značilno višja pri bolnikih z genotipom s T/T v primerjavi s tistimi, ki imajo genotip s C/T ali s C/C (Ito in sod., 2007).

Polimorfizmi gena *IL-1B* -511 in -31 prispevajo k razvoju raka želodca z alelom T, ki poveča izražanje gena (količino mRNA) *IL-1B* in neposredno inhibira izločanje želodčne kisline. Manj želodčne kisline predstavlja dejavnik tveganja za razvoj raka, ker s tem omogoči preselitev bakterije *H. pylori* iz antruma v korpus želodca. Na žalost predominantni gastritis korpusa z naselitvijo bakterije omogoči razvoj atrofičnega gastritisa in celo raka želodca. Povišana vrednost želodčnega pH in hkrati okužba s *H. pylori* močno povečata koncentracijo N-nitroso snovi, ki so domneven promotor karcinogeneze in razvoja tumorjev. Več študij je razkrilo, da hipoklorhidrija, ki jo sproži preveliko izražanje gena *IL-1B*, vodi do raka želodca. Sposobnost izločanja kisline sluznice želodca je kritičen dejavnik določanja kliničnega

rezultata okužbe s *H. pylori*. Bakterija se predominantno nahaja v antrumu sluznice in kjer je višja vrednost pH. Pri določenih posameznikih s hipoklorhidrijo pa bakterija dobi priložnost prehoda v korpus. Rezultat je velika razjeda in malo kisline, ki omogoči atrofijo ali razvoj raka želodca (Hu in sod., 2005).

Hu in sodelavci (2005) so v svoji raziskavi odkrili, da sta stopnja stimulacije pentagastrina in izločanje želodčne kisline enaki pri *H. pylori* pozitivnih in negativnih bolnikih. Tako pri različnih genotipih *IL-1B* -511 ni bilo razlik pri izločanju kisline. Višji nivo IL-1 β posledično ne vpliva na večje izločanje *in vivo*, zato so hipotezo, da okužba s *H. pylori* vodi do povečanega izražanja gena *IL-1B* v genotipu IL-1 β -511*T/T in s tem zavre izločanje same želodčne kisline, ovrgli. Šlo je za študijo v regijah z nizko prevalenco za rak želodca (Hu in sod., 2005).

2.6.4 Polimorfizma genov *IL-1B* -511C/T in *IL-1RN2/2 in rak želodca**

Alel *IL-1RN**2 aktivira vnetne reakcije in tako celokupno poveča aktivnost IL-1 in zmanjša aktivnost IL-1ra. V nekaterih študijah so dokazali nasprotno delovanje *IL-1RN**2 na količino IL-1ra. Torej nekateri trdijo, da je alel *IL-1RN**2 povezan z zmanjšanjem IL-1ra, drugi pa da ni neke značilne povezave med njima oziroma celo, da polimorfizem vpliva na povečanje količine IL-1ra. Nekateri izmed teh diskrepanc lahko nastanejo zaradi različnega načrtovanja izvedbe študije ali gre za prisotnost heterogenosti s še kakšnim polimorfizmom v genu *IL-1RN*. Vredno je opomniti, da je genotip *IL-1RN**2/2 večkrat v povezavi z boleznimi kot *IL-1RN**1/2, še posebej pri razvoju raka želodca. *In vitro* opazovanja so privedla do sklepa, da so VNTR alela 2 v povezavi z zmanjšanjem proizvodnje IL-1ra in povečanja sinteze IL-1 β . Znano je tudi, da so prisotni različni genetski profili skupine genov za IL-1 med različnimi etničnimi skupinami, še posebej med črnsko in belsko populacijo (Cauci in sod., 2010).

Poznejše faze raka želodca so potrdili v povezavi s polimorfizmi sklopa genov za IL-1 v kromosomu 2q, ki vsebuje tri sorodne gene v regiji veliki 430 kb. Teoretično velja, da spremembe v teh genih lahko vplivajo na imunski odziv proti patogenim, kot je *H. pylori* in na razvoj malignih histoloških sprememb na sluznici želodca. Pri bolnikih s poznejšo fazo razvoja raka je največkrat odkrit alal *IL-1B* -31*C in *IL-1B* -511*T in haplotip *IL-1B* -31*C/*IL-1B* -511*T. Alel *IL-1RN**2 in homozigotni genotip *IL-1RN**2/2 so odkrili pri povišani prevalenci za raka želodca. Alela *IL-1RN**2 in *IL-1B* -511*T sta v povezavi s povečano sintezo vnetnega citokina IL-1 β (Glas in sod., 2004). Bolj pogost haplotip je *IL-1B* -31T/*IL-1B* -511C, redkejši je *IL-1B* -31C/*IL-1B* -511T. (Ito in sod., 2007).

Našli so tudi povezavo med zgodnjimi fazami razvoja raka in homozigotnim tipom *IL-1RN**2/2. VNTR introna *IL-1RN* vsebuje tri potencialna vezavna mesta za proteine; za utiševalca IFN- α A, utiševalca IFN- β B in element akutne faze odziva. S tem je funkcionalno odvisen. Koncentracija IL-1ra v sluznici je odvisna od števila alelov *IL-1RN**2, ker pri različnih oblikah kolitisa prenašalci homozigotnega genotipa *IL-1RN**2/2 kažejo nižji nivo IL-1ra v sluznici. Odkrili so povezave alela *IL-1RN**2 z raznolikimi vnetnimi in avtoimunimi stanji, ki so posledica vloge vnetnega alela *IL-1RN**2. Homozigotni tip *IL-1RN**2/2 je identificiran kot faktor tveganja tudi pri ezofagealnem raku (Glas in sod., 2004).

Machado in sodelavci (2002) so odkrili povečano tveganje za rak želodca pri prenašalcih alela *IL-1B* -511*T, ki so homozigoti za alel *IL-1RN**2 z razmerji obetov 3,3 (OR=3,3). Dokazali so tudi, da prenašalci *IL-1B* -511*T in homozigoti *IL-1RN**2 razvijejo resnejši gastritis, s tem hujše vnetje v predelu korpusa, poškodbe epitelija v korpusu in antrumu in prisotnost glandularne atrofije. Rezultati prikazujejo posreden dokaz vpliva povišanega vnetja pri alelih *IL-1B* -511*T in *IL-1RN**2. Hkrati povezava med povečanim vnetjem v korpusu in genotipom IL-1 ustreza vzorcu gastritisa s *H. pylori* in sproženo karcinogenezo želodca; gastritis z vplivom izločanja kisline v korpusu vodi do hipoklorhidrije, atrofije želodca in povečanega

tveganja raka želodca. Nasprotno pa gastritis v antralnem delu želodca vodi do povečane produkcije kisline in večjega tveganja za duodenalne razjede (Machado in sod., 2002).

Zaključili so, da je obširnost poškodbe sluznice odvisna od seva bakterije, vnetnega odziva gostitelja in interakcij med gostiteljevimi in bakterijskimi dejavniki. Kombinacija teh vodi do hipoklorhidrije, atrofije korpusa in povečanega tveganja za razvoj raka (Machado in sod., 2002).

Ugotovili so, da podaljšano in trajno zaviranje izločanja kisline, kot rezultat delovanja vnetnih citokinov, predvsem IL-1 β , lahko vodi do razširjanja bakterije iz antruma v korpus kar ogrozi izločanje kisline parientalnih celic in vodi do patoloških sprememb – atrofija, intestinalna metaplazija, displazija in na koncu karcinogeneze intestinalnega tipa raka želodca. Karcinogeneza difuznega tipa ni vpletena pri večstopenjskem procesu, niti pri takih genotipih. Intestinalni tip raka je torej v povezavi z iskanimi aleli, vendar samo v kavkazijski populaciji ne pa azijski (Xue in sod., 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI BOLNIKOV

V raziskavo smo vključili 96 bolnikov iz Slovenije; od tega jih je imelo 59 diagnosticiran kronični gastritis in 37 adenokarcinom želodca. Raziskava predstavlja epidemiološko študijo primerov in kontrol, kjer so rakavi bolniki predstavljali eno skupino primerov, bolniki z gastritisom pa drugo skupino. Glede na skupini primerov so bile izbrane ustrezne kontrole primerljive po starosti in spolu. Kontrole so predstavljali zdravi krvodajalci. Diagnostika je temeljila na histologiji bioptičnih vzorcev po Sydneyski klasifikaciji med letoma 2007 in 2010. Kužnine so bile odvzete bolnikom z želodčnim rakom, zdravljenim v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor in bolnikom s kroničnim gastritisom iz specialistične gastroenterološke ambulante Abakus Medico, Diagnostični center Rogaška Slatina. Vzorce kontrol pa smo dobili s kliničnega oddelka za reprodukcijo Ginekološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Preiskovanci so bili ustno obveščeni o vključitvi v raziskavo in so vanjo pisno privolili. Iz Maribora in Rogaške Slatine smo poleg bioloških vzorcev pridobili tudi osnovne podatke bolnikov.

Primerljivost vseh preiskovanih skupin po starosti, spolu in statusu *H. pylori* zagotavlja, da smo z raziskavo preverili gostiteljeve dejavnike, ki dejansko razlikujejo med običajnim benignim potekom in slabšim malignim potekom okužbe s transformacijo želodčne sluznice.

Pri vseh bolnikih smo dokazovali okužbo s *H. pylori* s kulturo iz biopta želodčne sluznice. Vzeti so jim bili tudi vzorci krvi in seruma za določitev genetskih polimorfizmov vnetnih citokinov in receptorja. Kri z EDTA in serumi so bili poslani v Laboratorij za pretočno citometrijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. S pomočjo serumov smo izvedli serološke metode za bolnike z adenokarcinomom, kri vseh pa

smo prenesli v Laboratorij za diagnostiko anaerobnih in aerobnih bakterijskih infekcij ter izvedli molekularno metodo izolacije DNA za nadaljnje raziskovanje.

Venska kri je najpogostejši klinični vzorec za molekularno diagnostiko. Bilo je zabeleženo, da se lahko iz takšne krvi pridobi več kot 70 % originalne DNA z visoko molekularno maso, kljub temu, da je shranjena z EDTA že 3 dni na sobni temperaturi. EDTA omogoča dober donos nukleinske kisline za metodo PCR. Zamrzovanje vzorca nima vpliva na kvantiteto in čistost ekstrahirane DNA (Lee in sod., 2010).

Vse vzorce smo hranili pri ustrezni temperaturi v hladilnikih in zamrzovalnih komorah.

3.2 LABORATORIJSKI MATERIALI IN OPREMA

- spiralec mikrotitrskih ploščic (Labsystem Multiwash, ZDA)
- spektrofotometer (Tecan-Sunrise remote, Salzburg, Avstrija)
- pipete, multi-kanalna pipeta, sterilni nastavki za pipete, epruvete in mikrocentrifugirke (Eppendorf GmbH, Dunaj, Avstrija)
- 500 in 1000 ml posoda (valj)
- mikrotitrskе ploščice, adhezijska folija za mikrotitrskе ploščice
- komplet za serologijo – »GAP[®]-IgG« (Biomerica, Newport Beach, Kalifornija, ZDA)
- aparatura za izolacijo DNA – »MagNA Pure Compact Instrument« (F. Hoffmann–La Roche Ltd, Basel, Švica)
- komplet za izolacijo DNA – »MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I« (Roche Applied Science, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija)
- komplet za ročno izolacijo DNA – »QIAamp DNA Mini Kit« (Qiagen N.V., Venlo, Nizozemska / Qiagen, Hilden, Nemčija)
- termoblok, vorteksno mešalo
- brezprašna varnostna komora (laminarij)

- svetlobni mikroskop
- Bunsenov gorilnik
- hitri identifikacijski testi (oksidaza, katalaza, ureaza)
- hladilnik in inkubator ali inkubacijska komora
- lonci za anaerobno atmosfero
- generator anaerobne ali mikroaerofilne atmosfere »AnoxomatTM Mark II« (Mart Microbiology B. V., Lichtenvoorde, Nizozemska)
- homogenizator tkiv »TissueLyser II« (Qiagen N.V., Venlo, Nizozemska)
- komplet za genotipizacijo KASP (Kbioscience, Hoddesdon, Velika Britanija)
- hladilni blok
- »LightCycler 480II« (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija)
- agarozna v prahu (Sigma-Aldrich Co, St. Louise, Missouri, ZDA)
- komplet začetnih oligonukleotidov za genotipizacijo *IL-1RN* (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Nemčija)
- »Master« reakcijska mešanica »HotStartTaq Plus« (Qiagen, Hilden, Nemčija)
- voda brez DNA – »DNA-free water« (Qiagen, Hilden, Nemčija)
- aparatura »Thermocycler T3000« (Biometra, Göttingen, Nemčija)
- elektroforezna banjica z nosilcem za gel, glavnikom in napajalnikom za generiranje električnega polja
- UV svetilka s fotoaparatom
- označevalec velikosti DNA – 1 kilobazna (kb) lestvica označene DNA znanih dolžin
- centrifuga »Eppendorf Centrifuge 5415R« z rotorjem FA-45-24-11 (Eppendorf GmbH, Dunaj, Avstrija)
- etidijev bromid (10 g/ml)
- pufri: 1x pufer Tris/acetat/EDTA (TAE), 1x fosfatni pufer (PBS), destilirana voda
- gojišča: Pylori agar (PYL), Patricija z antibiotiki (P+A), Mueller Hinton agar (MHA)

3.3 METODE DELA

3.3.1 KULTURA *Helicobacter pylori*

H. pylori je po Gramu negativni uviti ali spiralni bacil, ki je izredno zahteven za gojenje *in vitro*. Zahteva ogromno hranil in mikroaerofilno atmosfero. Delati je potrebno povsem aseptično, saj lahko zlahka kontaminiramo gojišča ter s tem preprečimo rast bakterije ali jo celo uničimo. Za pripravo kulture je obvezno imeti homogenizator tkiv, ogenj, cepilne zanke, inkubator, generator mikroaerofilne atmosfere, hladilnik, mikroskop, identifikacijske teste (Slika 5).

3.3.1.1 Princip metode

Metoda sloni na kultivaciji bakterije in po tem na določanju občutljivosti za antibiotike. Biopt sluznice želodca se transportira v transportnem gojišču Portagerm pylori (Biomérieux) 2 do 4 dni pri sobni temperaturi ali v hladilniku pri +4 °C. Odvzame se minimalno 1 biopsijo antruma želodca, optimalno pa 2 biopsiji antruma in 2 biopsiji korpusa želodca. Pri metodi se uporabljajo gojišča, reagenti za pripravo direktnega preparata, identifikacijo in določanje občutljivosti.

3.3.1.2 Protokol

Biopt smo homogenizirali v 1 mL fosfatnega pufra (PBS – 78,9 g natrijevega klorida NaCl, 26,1g kalijevega hidrogen fosfata K₂HPO₄, 3,9 g kalijevega dihidrogen fosfata KH₂PO₄, 1000 ml destilirane vode). 0,5 ml homogenata smo potem nacepili na dve selektivni gojišči. Gojišča smo inkubirali 72 ur v mikroaerofilnih pogojih pri 37 °C. Mikroaerofilne pogoje smo vzpostavili z »Anoxomatom«. Preostanek homogenata smo shranili v zamrzovalni omari pri –70°C.



Slika 5: Homogenizator tkiv »TissueLyser II« (levo) (Qiagen GmbH, 2011: 1) in generator anaerobne ali mikroaerofilne atmosfere »AnoxomatTM Mark II« (desno) (Mart Microbiology B. V., 2006: 1).

Preglednica 1: Inokulacija in inkubacija *Helicobacter pylori*

Standardna gojišča	Inkubacija			Pregled gojišč
	T (°C)	atmosfera	čas	
Pylori agar (PYL) (PolyVitex, konjska plazma, antibiotiki)	37	mikroaerofilna	9-14 dni	/ 3 dni
Patricija z antibiotiki (P+A) (52 g baze BHI agarja, 100 ml konjske krvi, 10 g kvasnega ekstrakta, isovitalex, 200 ml konjskega seruma, 1 ml 4000 μ g/ml vankomicina, 1 ml 2000 μ g/ml amfotericina B)	37	mikroaerofilna	9-14 dni	/ 3 dni

3.3.1.3 Identifikacija

Tipične kolonije *Helicobacter pylori* so drobne (do 0,5 mm) in prozorne. Za identifikacijo osamljenih kolonij smo naredili: (i) mikroskopski preparat obarvan po Gramu in (ii) dokaz encimov: ureaze, katalaze in oksidaze. Semikvantitativno smo ocenili količino bakterij (1-3+) in opredelili ali gre za nativen izolat ali za izolat po večkratno neuspešnem antibiotičnem zdravljenju.

Občutljivost za antibiotike smo določili z E-testi. Za E-teste smo uporabili inokulum 3 McFarland (McF), ki smo ga inkubiramo mikroaerofilno 72 ur na MHA (38 g Mueller Hinton agarja, 5 % konjske krvi).

Pozitivna preiskava pomeni okužbo, to je uspešna rast na selektivnih gojiščih, uspešna identifikacija bakterije ter opravljen antibiogram.

3.3.2 HISTOLOGIJA

Histoloških metod nismo opravljali sami, ampak smo izvide naših bolnikov dobili iz Oddelka za patologijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor. Metode temeljijo na histoloških preparatih resekcij želodca in gastrokopskih pregledov ter pregledov odščipov želodca pobarvanih po H&E.

Izvide smo razdelili glede na klinično diagnozo, in sicer ali je imel bolnik diagnosticiran gastritis ali adenokarcinom želodca. Pri gastritisih smo določevali kateri deli želodca so bili odščipljeni (antrum, korpus, oba), kolikšno je vnetje in ali so bili pri pregledu prisotni *H. pylori*, atrofija sluznice in metaplazija. Biopsijske vzorce iz antruma in korpusa bolnikov s kroničnim gastritisom smo iz izvidov histološko opredelili v skladu z Houstonko modifikacijo Sydneyskega sistema klasifikacije in gradacije gastritisov. Biopsijske vzorce rakov smo v skladu s Laurenovo klasifikacijo ovrednotili na intestinalni, difuzni in atipični

karcinom želodca. Določili smo kolikšen je njegov gradus, preverjali smo prisotnost bakterije ter določili klasifikacijo TNM.

3.3.3 SEROLOGIJA

Okužbo bolnikov s *H. pylori* smo dokazali s histološkimi metodami, pri rakavih bolnikih pa smo jo potrdili še s serološkim testom »GAP[®]-IgG« (Biomerica, Newport Beach, Kalifornija, ZDA), za določevanje protiteles IgG proti *H. pylori* (ELISA-HP IgG). Poleg kompleta smo za izvedbo testa potrebovali tudi spiralec za mikrotitrne ploščice (LabSystem Multiwash, ZDA) in fotometer za pregled rezultatov (Tecan-Sunrise remote, Salzburg, Avstrija).

Komplet GAP IgG za izvedbo testa vsebuje:

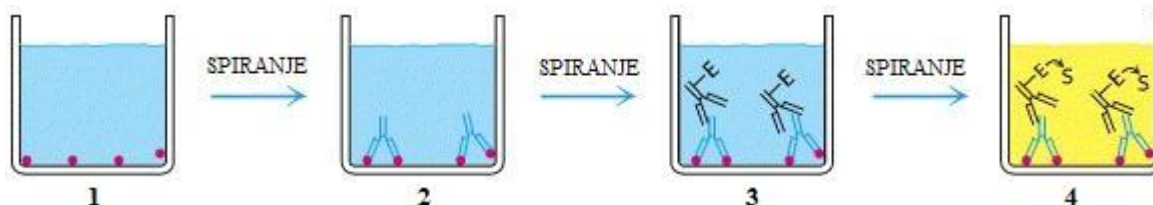
- plošče z 12 x 8 mikrotitrskih vdolbinic prekritih na dnu z inaktiviranimi antigeni *H. pylori*,
- GAP IgG kalibrator 0 do 5 po 1 ml s koncentracijami 0, 12.5, 25, 50, in 100 enot/ml protiteles IgG proti *H. pylori*,
- GAP IgG pozitivna kontrola (1 ml) za protitelesa IgG proti *H. pylori*,
- GAP IgG negativna kontrola (1 ml) protitelesa IgG proti *H. pylori*,
- 10 ml encimskega konjugata (konjugat kozjih proti humanih protiteles IgG s hrenovo peroksidazo v TRIS/BSA pufri),
- 8 ml substratne raztopine A (TMB v acetatnem pufri z DMSO),
- 8 ml substratne raztopine B (vodikov peroksid v acetatnem pufri),
- 20 ml fosfatnega pufra za redčenje,
- 20 ml fosfatnega pufra za spiranje,
- 6 ml 1N raztopine H₂SO₄ za ustavljanje reakcije.

Prisotnost bakterije *H. pylori* lahko zaznamo z invazivnimi in neinvazivnimi metodami. Serološki testi so neinvazivni, enostavni, hitro izvedljivi, kjer indirektno določamo okužbo s

H. pylori (Schembri in sod., 1993). Na tržišču obstaja kar nekaj komercialnih testov, vendar se med seboj razlikujejo po svoji občutljivosti in specifičnosti. »GAP-IgG« ima dobro občutljivost (približno 93 ± 95 %), vendar pa slabšo specifičnost ($66 - 71 \pm 71$ %) (Szeto in sod., 2001). Proizvajalec je s svojim testiranjem ocenil 99,4-odstotno občutljivost in 93,5-odstotno specifičnost. Neodvisna študija testa je pokazala 85 do 100-odstotno incidenco kroničnega atrofičnega gastritisa pri bolnikih, ki so imeli pozitiven rezultat na test »GAP IgG« (Biomerica, Newport Beach, Kalifornija, ZDA) in diagnozo. Kombinirana uporaba testov IgG in IgA pa lahko izboljša njegove lastnosti. Ker bakterija *H. pylori* povzroča okužbo sluznice, je lahko sistemski protitelesni odziv slab. Test »GAP IgG« ima rezultatsko široko sivo cono (19 %). To pomeni, da ne moremo za vse vzorce trditi ali so pozitivni ali negativni, ampak nekako ustrezajo vmesnim rezultatom. V kombinaciji s serološkim testom »GAP IgM« ima IgG občutljivost večjo od 80 % (Szeto in sod., 2001).

3.3.3.1 Princip postopka

»GAP IgG« je kvantitativni test, ki temelji na principu testa ELISA za zaznavanje specifičnih protiteles proti *H. pylori* v humanem serumu in nam ne poda titra protiteles. Delno očiščeni antigeni bakterije so imobilizirani na dnu vdolbinic mikrotitrne plošče. V kolikor so v človeškem serumu navzoča protitelesa proti bakterijskim antigenom, se vežejo nanje in nastane specifičen imunski kompleks. Nespecifična protitelesa se sperejo in tako odstranijo. Kompleks nato dokažemo z dodatkom konjugata sekundarnih anti-humanih protiteles IgG z vezano hrenovo peroksidazo. Odvečni encimski konjugat se spere ter se doda specifičen substrat za encim hrenovo peroksidazo (Slika 6). Vezava sekundarnih protiteles je proporcionalna vezavi primarnih iz bolnikove plazme in množini razgrajenega substrata. Encim hrenova peroksidaza razgrajuje substrat zelo močno, zato je po določenem času potrebno encimsko reakcijo ustaviti. Mikrotitrne plošče pregledamo s fotometrom, ki nam nato računalniško izpiše rezultate.



Slika 6: Princip zaznavanja specifičnih protiteles IgG v serumu bolnika (indirektna ELISA) (Goldsby in sod., 1999: 162).

Legenda:

1. dno mikrotitrne vdolbinice prekrito z antigeni, 2. vezava specifičnih protiteles na antigen, 3. vezava sekundarnih protiteles proti specifičnim protitelesom z encimi na primarna protitelesa, 4. dodatek substrata in pretvorba le tega z encimom v obarvan produkt

3.3.3.2 Protokol

Vzorci plazme bolnikov, sodelujočih v študiji smo imeli shranjene pri temperaturi $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dan pred izvajanjem seroloških metod smo izločili 37 epruvetk s plazmami rakavih bolnikov in jih čez noč shranili pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zjutraj smo jih odtalili pri sobni temperaturi. Medtem smo pripravili potrebne raztopine za izvedbo protokola ter jih ustrezno redčili, tako da smo odstranili precipitirane kristale v pufu.

- Pufer za redčenje smo pred uporabo redčili 1:25 - v posebno posodico volumna 500 ml smo dali 20 ml redčitvenega pufra in dolili 480 ml destilirane vode do oznake posodice 500 ml.
- Pufer za spiranje smo redčili pred uporabo 1:50 - v posodo z volumnom 1 litra smo dali 20 ml spiralnega pufra in dodali 980 ml destilirane vode do oznake posode za 1 l.

Ko so se vzorci odtalili smo jih premešali na vorteksnem mešalu, da so se protitelesa enakomerno razporedila in nato naredili posamezne redčitve vzorcev 1:200 v označenih

epruветah (25 μ l vzorca + 5 ml pufra za redčenje). Sledilo je nanašanje vzorcev v mikrotitrsko ploščico:

- V dolbinico A1 smo pustili prazno – slepi vzorec (blank).
- V dolbinice B1 do F1 smo nanесли po 100 μ l referenčnih serumov, ki smo jih dobili v kompletu, v dolbinico G1 100 μ l negativnega kontrolnega seruma in v dolbinico H1 100 μ l pozitivnega kontrolnega seruma.
- Testne serume smo dodajali v dvojnikih po 100 μ l. Torej dolbinici A2 in B2 sta nam predstavljali isti vzorec v dveh ponovitvah. Zapisali smo si posamezne pozicije vzorcev. Ploščico smo prekrili z adhezijsko folijo in jo inkubirali pri sobni temperaturi 60 minut.
- Po inkubaciji smo sprali dolbinice trikrat s po 300 μ l spiralnega pufra. Spirali smo na spiralcu za mikrotitrsko ploščico in ostanek popivnali s papirnato brisačo.

Sledilo je dodajanje konjugata:

- Odpipetirali smo po 100 μ l raztopine konjugata IgG v vse dolbinice, razen A1. Ploščico smo prekrili z adhezijsko folijo in jo inkubirali pri sobni temperaturi 30 minut. Po inkubaciji smo sprali dolbinice trikrat s po 300 μ l spiralnega pufra.

Največ 1 uro preden smo dodali substrat, smo zmešali substratno raztopino A in substratno raztopino B v razmerju 1:1. Uporabili smo multi-kanalno pipeto in v vsako kolono na mikrotitrski ploščici odpipetirali po 800 μ l sveže pripravljene raztopine substrata. Torej v vsako dolbinico, tudi A1, po 100 μ l substrata. Ploščico smo prekrili z adhezijsko folijo in jo inkubirali pri sobni temperaturi v temi 10 minut. Dobili smo modro obarvanje raztopine.

Po natančno 10 minutah smo dodali 50 μ l raztopine za zaustavljanje reakcije in dobili rumeno obarvanje. Absorbanco smo izmerili pri 450 nm (program na fotometru Tecan Sunrise remote, Salzburg, Avstrija). Meritev je morala biti opravljena v roku 1 ure. Fotometer nam je podal rezultate v obliki grafa in tabel. Ostanek plazem smo shranili v hladilnik pri -70 °C.

3.3.4 IZOLACIJA DNA

Pri koraku izolacije DNA smo izvedli osamitev očiščene celokupne nukleinske kisline z aparaturo »MagNA Pure Compact Instrument« (F. Hoffmann–La Roche Ltd, Basel, Švica). Uporabili smo komplet »MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I« (Roche Applied Science, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija), ki v pakiranju vsebuje:

- 32 zapečatenih kartuš z reagenti za eno izolacijo (proteinaza K, litični pufer, magnetni stekleni delci, 3 spiralni pufri, elucijski pufer),
- 32 kompletov nastavkov za pipete (2 velika, 1 majhen, 1 pripomoček za prebadanje folije na kartušah),
- 35 tubic velikosti 2,0 ml za vzorec,
- 35 elucijskih tubic velikosti 2,0 ml z črnimi kodami,
- 35 pokrovčkov za elucijske tubice.

Učinkovita izolacija DNA iz različnih tkiv je ključna za analizo mutacij ali pomnoževanja genov. Zato je Roche Applied Science razvil komplete in protokole za avtomatizirano izolacijo genomske DNA z uporabo sistemov »MagNA Pure Compact System« (Slika 7). Ta sistem je sestavljen iz povsem avtomatiziranega aparata in kompleta za takojšnjo uporabo z že pripravljenimi kartušami, ki omogočajo izolacijo nukleinske kisline iz 1 do 8 vzorcev v 25 do 40 minutah na serijo, odvisno od protokola (Kirchgesser in sod., 2006). To je predvsem uporabno v raziskovalnih laboratorijih z manjšim številom vzorcev (Waltenberger in sod., 2004).



Slika 7: Aparatura za izolacijo nukleinske kisline »MagNA Pure Compact Instrument« (Roche Applied Science, 2003: 11).

Sistem omogoča veliko variant protokolov, fleksibilnost v tipu vzorca, volumnu vzorca, elucijskemu volumnu ter tarčni nukleinski kislini. Vsebuje že vnaprej napolnjene kartuše z reagenti in odstranljivimi dodatki (Slika 8). Vsi koraki izolacije nukleinske kisline so avtomatizirani in temeljijo na dokazani tehnologiji z magnetnimi kroglicami. Aparatura avtomatsko izpelje korake celotne izolacije; liza celic, obarjanje proteinov, vezava DNA, korake spiranja in elucije očiščene nukleinske kisline. Reagenti in koraki protokola so optimizirani za doseg zadostne količine nukleinske kisline iz sesalske krvi, plazme, seruma ali kultivirajočih celic.

Tako izolirana nukleinska kislina je visoko kvalitetna in ne kaže nobene inhibicije PCR. Reprodutivnost je odlična ter ni prisotne navzkrižne kontaminacije (Kirchgesser in sod., 2003). Ekstrakcija kaže dobro linearnost, določljivost titra in volumna vzorca na skali ter odlično občutljivost. Test je osredotočen na elucijski stabilnosti, reprodutivnosti,

določljivosti na skali, občutljivosti in linearnosti glede na ostale metode. Največja prednost je, da je predpriprava hitra in enostavna, saj so kartuše že napolnjene z reagenti, ter da sistem zmanjšuje število napak in omogoča izvedbo veliko serij v zelo kratkem času.



Slika 8: Vnaprej napolnjena kartuša z reagenti za takojšnjo uporabo, označena s črtno kodo (Roche Applied Science, 2003: 11).

3.3.4.1 Princip delovanja tehnologije magnetnih delcev

Ločevanje nukleinske kisline je pomembno orodje molekularne biologije. Predno smo lahko uporabljali moderne tehnologije, je bilo ločevanje nukleinske kisline dolgo trajajoč in težaven proces, ki je temeljil na številnih ekstrakcijah in korakih centrifugiranja. Pogosto je bil omejen z majhnimi količinami in slabo čistostjo ločenega produkta, ki pa tako ni bil primeren. V zadnjih letih so razvili specifično funkcionalne magnetne delce. Skupaj z ustreznim puferskim sistemom omogočajo hitro in učinkovito čistost neposredno po ekstrakciji iz surovih neobdelanih celičnih ekstraktov. Koraki centrifugiranja so izpuščeni iz postopka. Dodatno je novi pristop omogočil lažjo avtomatizacijo celotnega procesa in izolacijo nukleinske kisline iz večjih volumnov vzorca.

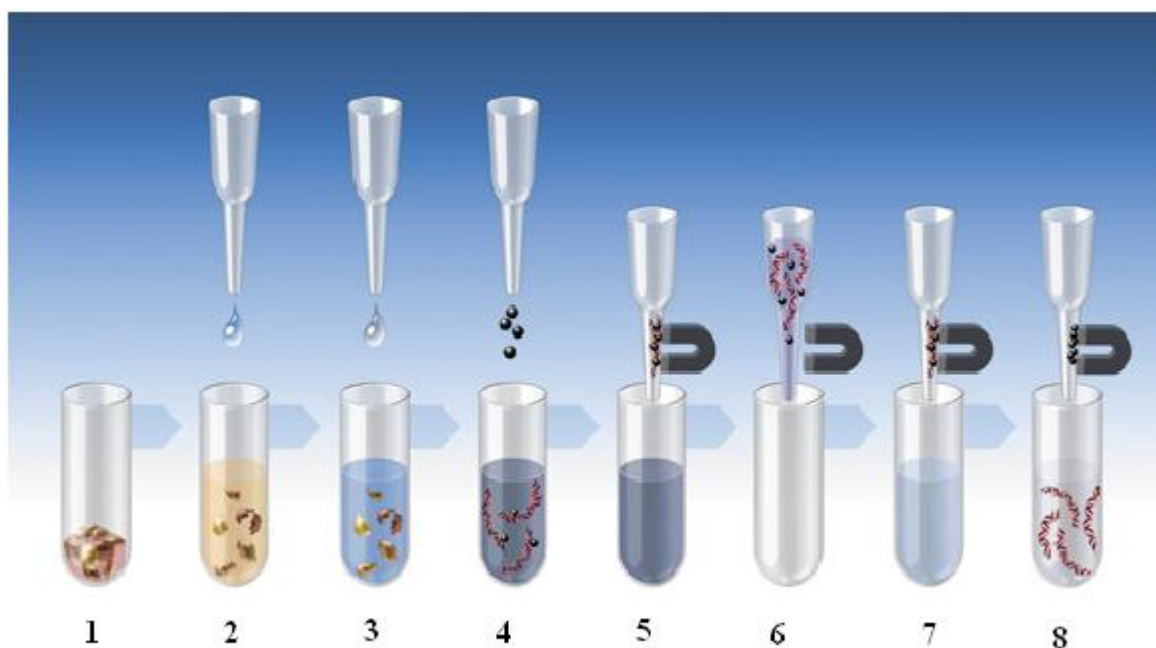
Magnetno ločevanje je tehnologija, ki uporablja magnetizem za učinkovito ločevanje mikrometrskih para- in feromagnetnih delcev iz kemijskih ali bioloških suspenzij. Ideja uporabe tehnike magnetnega ločevanja je očiščenje biološko aktivnih komponent (nukleinskih kislin, proteinov...), celic in celičnih organelov (Slika 9). Metoda ima več prednosti v primerjavi z ostalimi tehnikami ločevanja. Nukleinske kisline lahko izoliramo direktno iz surovih neobdelanih materialov kot so kri, tkivni homogenati, kultivacijski mediji, voda... Delci se lahko uporabljajo v seriji procesov, kjer skoraj da ni omejitev za volumen vzorca. Glede na možnost regulacije magnetnih lastnosti trdih materialov, jih lahko posamezno odstranimo relativno lahko celo iz viskoznih suspenzij vzorcev. V bistvu je magnetno ločevanje edina možna metoda za pridobivanje majhnih delcev iz bioloških homogeniziranih ali odpadnih materialov istih velikosti. Delce, ki imajo magnetni moment, lahko odstranimo z uporabo magnetnega polja z uporabo stalnega magneta. To je hitra, enostavna in učinkovita pot ločevanja delcev po vezavi nukleinske kisline ali koraka elucije in precej manj rigorozna metoda kot tradicionalne tehnike centrifugiranja, ki proizvaja močne sile in lahko vodi v razpad nukleinske kisline. Po navadi je zadosti uporabiti magnet na strani nosilca, ki vsebuje mešanico vzorca, za nakopičenje delcev blizu stene nosilca in odtekanje ostankov vzorca. Za proces izolacije se uporabljajo magnetni nosilci z imobiliziranimi afinitetnimi ligandi ali pripravljene iz biopolimerov, podobnih tarčni nukleinski kislini. Ti delci so proizvedeni iz različnih sintetičnih polimerov, biopolimerov, poroznega stekla ali anorganskih magnetnih materialov, kot je površinsko modificiran železov oksid. Posebej ustrezni so super-magnetni delci, ki ne vplivajo drug na drugega ob odsotnosti magnetnega polja. Premer delcev je približno med 0,5 in 10 μm , vendar so materiali z večjo površino boljši za vezavo nukleinske kisline (Berensmeier, 2006).

3.3.4.2 Protokol

Vzorci krvi z EDTA, iz katerih smo izolirali celokupno nukleinsko kislino, so bili predhodno shranjeni pri temperaturi $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, en dan pred uporabo pa pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nato smo jih prenesli v laboratorij za izolacijo nukleinske kisline in postavili v biološko komoro za varno

delo ter počakali da se odtalijo. Medtem smo pripravili aparaturo za izolacijo, in sicer smo v posebno stojalo vstavili 8 kartuš za 8 posameznih vzorcev. Kartuše z reagenti smo prej dobro pretresli, da so se magnetni delci v tretji luknjici kartuše enakomerno razporedili po celotni raztopini, saj imajo visoko afiniteto za sedimentacijo. Kartuše smo ustrezno kodirali s čitalcem za črtne kode. Nato smo računalniško potrdili kartuše, izbrali ustrezen protokol izolacije DNA-blood 100-400 V312 ter določili volumen vzorca 400 μ l in elucijski volumen 100 μ l. V posamezne luknjice smo ustrezno vstavili tudi modele s pipetnimi nastavki in jih programsko potrdili.

V posebnem stojalu za tubice smo razporedili 8 tubic za vzorce in 8 tubic označenih s črtno kodo za očiščeno izolirano DNA. Vzorce smo 15 sekund mešali na vorteks mešalu in rahlo vse skupaj premešali še s pipeto, da so se celice enakomerno razporedile. V tubice za vzorce smo v laminariju odpipetirali 400 μ l krvi z EDTA in postavili nazaj v stojalo. Po pipetiranju smo stojalo s pripravljenimi vzorci prenesli v aparaturo in potrdili vzorce ter jih ustrezno poimenovali. V stojalo z vzorci smo vstavili še stojalo z elucijskimi tubicami, katere smo predhodno kodirali s čitalcem za črtne kode in ustrezno označili kot vzorec izolirane nukleinske kisline za nadaljnje delo. Vse vnesene podatke v računalnik smo potrdili, zaprli vrata aparature ter pritisnili START, da se je začel postopek izolacije nukleinske kisline. Varnostno komoro smo po uporabi počistili z natrijevim hipokloritom in prižgali UV svetilko za dekontaminacijo. Po končanem postopku izolacije smo elucijske tubice pokrili s pokrovčki in jih shranili pri -70 °C za nadaljnjo uporabo. Vse ostale uporabljene stvari (kartuše, nastavke za pipete, fiolce z vzorci...) smo odvrgli v za to primeren kontejner. Program nam je podal ustreznost rezultatov s PASS, neustreznost pa s FAIL.



Slika 9: Princip izolacije nukleinske kisline s tehnologijo magnetnih delcev (Roche Applied Science, 2009a: 1).

Legenda:

1. odpipetiran vzorec, 2. dodatek litičnega pufru (razgradnja celic), 3. dodatek proteinaze K (razgradnja proteinov), 4. dodatek magnetnih delcev in vezava nukleinske kisline na njihovo površino, 5. lovljenje magnetnih delcev z vezano nukleinsko kislino, 6. spiranje s spiralnim pufrom, 7. ločevanje nukleinske kisline od magnetnih delcev, 8. sprostitvev nukleinske kisline pri visoki temperaturi z elucijskim pufrom

3.3.5 ROČNA IZOLACIJA DNA

Pri vzorcih krvi z EDTA, ki so bili zelo gosti ali pa je bil njihov volumen zelo majhen, smo DNA ročno izolirali s pomočjo kompleta »QIAamp DNA Mini Kit« (Qiagen, Hilden, Nemčija), ki se ga uporablja za izolacijo DNA iz bakterijske kulture in homogeniziranih vzorcev tkiv. Uporabili smo protokol kompleta »QIAamp DNA Blood Mini Kit« (Qiagen, Hilden, Nemčija).

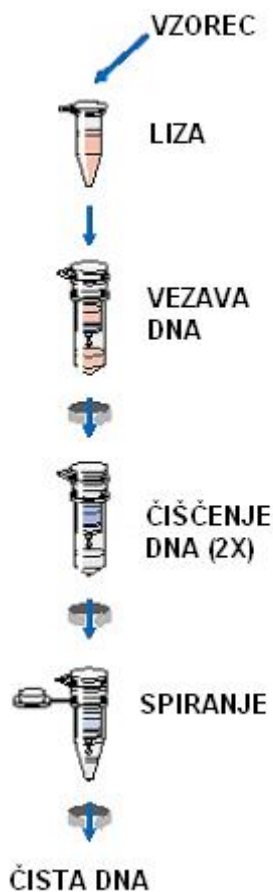
Za izvedbo protokola potrebujemo:

- »QIAamp DNA Mini Kit« (Qiagen),
- termoblok,
- epruvice 1,5 ml (Eppendorf),
- zbiralne tubice 2 ml,
- pipete, sterilni nastavki, rokavice,
- laminarij.

3.3.5.1 Princip postopka

Metoda ekstrakcije DNA temelji na tehnologiji centrifugiranja – »QIAamp Spin Protocol« (Lee in sod., 2010). Po lizi celic, se lizat prenese v kolono z membrano iz silikagela (posebna tubica v kompletu). Kolono se centrifugira in tako se DNA absorbira na membrano. Slednjo se nato spira z dvema pufroma (AW1 in AW2). S tem odstranimo beljakovine, maščobe in ostale komponente, ki zavirajo PCR. Izolirano DNA se eluira v pufu AE in shrani pri -70°C . Metoda je optimizirana le za vzorce volumna 200 μl (Slika 10).

Ena izmed slabosti ekstrakcije DNA s tehnologijo centrifugiranja je ta, da se kolone za spiranje ne usedejo popolnoma v tubice za zbiranje filtrata. Tako lahko pride do navzkrižne kontaminacije z aerosili, ki se sprostijo med centrifugiranjem. Postopek ima v primerjavi z metodo tehnologije magnetnih delcev nekaj slabosti, saj je slednja v prednosti zaradi enostavnosti izvedbe in potenciala avtomatizacije. Kljub temu pa je vprašljiva učinkovitost ekstrakcije DNA, saj je pri ročnih izolacijah DNA sama kvaliteta in kvantiteta dobljene DNA višja kot pri metodi avtomatizirane izolacije DNA (Lee in sod., 2010).



Slika 10: Princip ročne izolacije nukleinske kisline s tehnologijo centrifugiranja (QIAamp Spin Protocol) (Qiagen GmbH, 2001: 13).

3.3.5.2 Protokol

Vzorci krvi smo odtalili in mešali na vorteksnem mešalu 15 sekund. V 1,5 ml epruvetko smo odpipetirali 20 μ l proteinaze K. Dodali smo 200 μ l vzorca krvi z EDTA in 200 μ l pufrja AL. Zopet smo mešali na mešalu vorteks 15 sekund in inkubirali pri 56 °C v termobloku 10 minut. Nato smo kratko centrifugirali in dodali 200 μ l etanola (96-100 %). Sledil je postopek

ponovnega kratkega mešanja in centrifugiranja. Vzorec smo prenesli v kolono z membrano, ki smo jo prej ustrezno označili. Centrifugirali (»Eppendorf Centrifuge 5415R« z rotorjem FA-45-24-11) smo 1 minuto pri 8000 obratih na minuto (rpm). Kolono z membrano smo prenesli v novo 2 ml zbiralno tubico. Staro tubico s filtratom smo zavrgli. Na membrano smo nanесли 500 μ l pufra za spiranje AW1. Nato smo centrifugirali 1 minuto pri 8000 obratih/min. Kolono z membrano smo zopet prenesli v novo 2 ml zbiralno tubico, staro tubico s filtratom pa smo zavrgli. Na membrano smo nanесли 500 μ l pufra za spiranje AW2. Tubico smo centrifugirali 3 minute pri 14000 obratih/min in nato še enkrat 1 minuto. Kolono smo prenesli v 1,5 ml označeno mikrocentrifugirko, zbiralno tubico pa smo zavrgli. V mikrocentrifugirko smo dodali 200 μ l pufra AE in inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Centrifugirali smo 1 minuto pri 8000 obratih/min. Kolono z membrano smo zavrgli, izolirano DNA pa shranili v zamrzovalni omari na -70 °C.

3.3.6 GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA IL-1 β

3.3.6.1 Iskanje nukleotidnega zaporedja in določanje mesta polimorfizma

Celotna nukleotidna zaporedja posameznih genov za vnetni citokin IL-1 β smo iskali v spletnih bazah podatkov NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) in ENSEMBLE (www.ensembl.org/index.html). Za boljši pregled in razumevanje smo preverjali zaporedja, prebrana naprej in prebrana nazaj ter tako lažje določili odseke, na katerih se nahaja iskano mesto polimorfizma. Zbrana zaporedja v formatu FASTA smo pregledovali z računalniškim programom »Gene Runner«. Analizirali smo do sedaj objavljene ugotovitve mest točkovnih mutacij ter jih s pomočjo programa »Vector NTI Advance 11« (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) našli, in sicer IL-1 β -511 C/T. Vse skupaj smo še enkrat preverili v spletni bazi podatkov NCBI, kjer so arhivirana referenčna nukleotidna zaporedja in posamezni polimorfizmi človeškega genoma.

rs16944: IL-1 β -511*C/T »forward« – naprej

5' -TAGCCCTCCC TGTCTGTATT GAGGGTGTGG GTCTCTACCT TGGGTGCTGT TCTCTGCCTC[G/A]
GGAGCTCTCT GTCAATTGCA GGAGCCTCTG AGGAGAAAAT TGACCTTTCT TGGCTGGGGC- 3'

rs16944: IL-1 β -511*C/T »reverse« – nazaj

5' - GCCCCAGCCAAGAAAGGTCAATTTCTCCTCAGAGGCTCCTGCAATTGAC AGAGAGCTCC
[C/T]GAGGCAGAGAACAGCACCCAAGGTAGAGACCCACACCCTCAATACAGACAGGGAGGGCTA -
3'

3.3.6.2 Genotipizacija

Polimorfizem smo analizirali z uporabo tehnologije KASP (KBioscience Competitive Allele-Specific PCR). Začetne oligonukleotide in reagente »Kasp On Demand« (KOD) smo naročili pri podjetju KBioscience (Hoddesdon, Velika Britanija). Poslali smo jim zgoraj navedena, 120 nukleotidov dolga zaporedja, na podlagi katerih so bili dizajnirani protokol za genotipizacijo in sledeči ustrezni začetni oligonukleotidi.

Preglednica 2: Zaporedja sestavljenih oligonukleotidov

Skupni reverzni začetni oligonukleotid	Označene sonde
rs16944: IL-1β -511	FAM
5'-GCCCCAGCCAAGAAAGGTCAATTTT-3'	5'-GGGTGCTGTTCTCTGCCTCG-3'
Alel FAM – C=G	VIC
Alel VIC – T=A	5'-GGGTGCTGTTCTCTGCCTCA-3'

Komplet za genotipizacijo polimorfizmov KASP je vseboval:

- dvakratno koncentracijo reakcijske mešanice,
- 100 μ l suspenzije pufra Tris-HCl s koncentracijo 10mM in pH 8,3 in začetnih oligonukleotidov z začetno koncentracijo 100 μ M ter končno 12 μ M za alel specifična začetna oligonukleotida in končno koncentracijo 30 μ M za skupni reverzni začetni oligonukleotid za posamezen polimorfizem,
- dimetilsulfoksid (DMSO) in
- magnezijev klorid (MgCl₂).

Že pripravljena reakcijska mešanica je vsebovala ustrezen pufer, poseben encim polimerazo K_TTaq, ekvivalentne koncentracije deoksi(ribo)nukleozid trifosfatov (dNTP-jev), amplikone – oligonukleotidne sonde, označene s fluorescentnimi barvili (fluorofori) FAM (485/520nm) in VIC (520/570nm), pasivno referenčno barvilo 5-karboksi-X-rodamin sukcinimidil ester (ROX), DMSO in magnezijeve ione Mg²⁺ (1,8 mM) ustrezne koncentracije. Za preverjanje ustreznosti aparature za PCR smo naročili tudi komplet za validacijo, ki pa je vseboval eno mikrotitrsko ploščico z vezano DNA na dnu vdolbinic, testno mešanico raztopine DNA, označene amplikone za posamezno fluorescentno barvilo (FAM, VIC, FAM/VIC) in pozitivno kontrolo za polimorfizem.

Za analizo genov je v zadnjih letih na voljo več različnih aparatov za PCR v realnem času. Medtem pa metode genotipizacije temeljijo na isti platformi. Tako so danes na voljo robustne metode določanja SNP-ov z alel-specifično PCR, poleg do sedaj vedno uporabljeno TaqMan metodo genotipizacije z zelo dragimi z dvojnimi fluorofor označenimi oligonukleotidi (Wu in sod., 2005).

Postopek smo tako izvajali na aparaturi za PCR v realnem času »LightCycler 480II« (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija). Uporabljali smo protokol,

ki se je imenoval »Touchdown protocol 61-55« – protokol za PCR s padajočo temperaturo prileganja, kjer z vsakim ciklom PCR pade temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov za 0,6 °C, ki smo ga dobili od proizvajalca reagentov.

»Touchdown (TD) protocol 61-55 °C«

- 1) 94 °C 15 minut
- 2) 94 °C 10 sekund
- 3) 61 °C 60 sekund
- 4) Padec - 0.6 °C/na cikel

Ponovimo koraka 2 in 3 9-krat (skupaj 10 ciklov), da dosežemo temperaturo prileganja 55 °C.

- 5) 94 °C 10 sekund
- 6) 55 °C 60 sekund

Ponovimo koraka 5 in 6 25-krat (skupaj 26 ciklov).

Gre za povsem navadno verižno reakcijo s polimerazo, kjer je prvi korak segrevanje reakcijske mešanice na 94 °C za 15 minut, za aktivacijo DNA-polimeraze s toploto. Drugi korak predstavlja denaturacijo molekule DNA, ki je prvi regularni cikel, in sicer sestoji iz segrevanja na 94 °C za 10 sekund in tako povzroča taljenje verige DNA z razpadom vodikovih vezi med komplementarnimi bazami in tvori enoverižno DNA. Koraka 3 in 4 predstavljata prileganje specifičnih začetnih oligonukleotidov na enoverižno DNA. Tvorijo se stabilne DNA/DNA vodikove vezi, v kolikor je začetni oligonukleotid komplementaren matrični verigi. Na dobljeni hibrid se veže polimeraza in začne sintezo DNA. Potem sledita koraka pomnoževanja in elongacije iskanega fragmenta, kjer polimeraza sintetizira komplementarno verigo DNA matrični verigi z dodajanjem dNTP-jev v smeri 5' 3'.

3.3.6.3 Princip tehnologije KASP za genotipizacijo

Genotipizacijski sistem KASP predstavlja homogeno tehnologijo, ki temelji na merjenju fluorescence ob koncu postopka. To imenujemo »endpoint-genotyping« oziroma genotipizacija na koncu. Gre za kompetitivno alel-specifično diskriminacijo s postopkom PCR, ki nam omogoča določiti alel na specifičnem lokusu znotraj genomske DNA za genotipizacijo polimorfizmov.

Postopek predstavlja enostaven, fleksibilen ter poceni način določevanja polimorfizmov ali genotipov insercij in delecij (Buyyarapu in sod., 2010).

Sistem je sestavljen iz dveh komponent:

- Kombinacije treh neoznačenih začetnih oligonukleotidov za določen polimorfizem.
- Univerzalne reakcijske mešanice, ki vsebuje vse ostale potrebne komponente, vključno s sistemom za fluorescenco in specifično polimerazo K_{Taq}.

Za delovanje sistema so ključni sestavljeni oligonukleotidi:

- Dva začetna oligonukleotida za specifičen alel – alel-specifični začetni oligonukleotid (eden za posamezen alel polimorfizma). Vsak začetni oligonukleotid vsebuje unikatno neoznačeno repno zaporedje na 5' koncu.
- En skupen reverzni začetni oligonukleotid.
- Dva začetna oligonukleotida označena na 5' koncu s fluorescentnim barvilom. Eden je označen s FAM, drugi z VIC. Ta zaporedja so ustvarjena za povezovanje z neoznačenimi repnimi zaporedji na 5' koncu alel-specifičnih oligonukleotidnih zaporedjih.
- Dva začetna oligonukleotida, ki imata na 3' koncu vezan dušilec signala. Ta zaporedja so komplementarna zaporedjem z vezanim fluorescentnim barvilom ter tako komplementarna repom vezanim na alel-specifičnih oligonukleotidnih zaporedjih. Zato

ta zaporedja vežejo komplementarna zaporedja označena s fluorescentnim barvilom, ter tako zadušijo signal fluorescence.

V začetnem koraku PCR se ustrezen alel-specifični začetni oligonukleotid veže na komplementarno zaporedje neposredno navzgor od mesta polimorfizma. 3' konec začetnega oligonukleotida je tako obrnjen k nukleotidu polimorfizma. Prav tako se veže tudi skupni reverzni začetni oligonukleotid ter tako poteče PCR, kjer potem alel-specifični začetni oligonukleotid postane matrična veriga. Med to fazo, s fluoroforom označen oligonukleotid ostane vezan s komplementarnim dušilcem fluorescentnega signala ter se tako še ne generira fluorescenca.

Ko reakcija teče dalje, eden izmed označenih oligonukleotidov ustreza zaporedju pomnoženega alela, ki predstavlja novo matrično verigo nukleotidov. Označeni oligonukleotid se odcepi od dušilca, se poveže s komplementarno verigo in ustvari se fluorescentni signal, ki ga prepoznamo in zabeležimo (Slika 11).

V kolikor je genotip določenega polimorfizma homozigot, se bo ustvaril le eden izmed mogočih fluorescentnih signalov. V kolikor pa je oseba heterozigot, pa bomo zabeležili mešan fluorescentni signal.



Slika 11: Princip tehnologije KASP za genotipizacijo z alelno diskriminacijo (Amersham Biosciences, 2003: 2).

Legenda: Taq – encim polimeraza Taq, DQ – dušilec fluorescence, F – fluorescentno barvilo

3.3.6.4 Princip protokola PCR s padajočo temperaturo prileganja »Touchdown PCR« – (TD-PCR)

PCR je hitra in enostavna metoda za pomnoževanje želenih fragmentov molekule DNA. Metoda je uporabna pri proučevanju zaporedij DNA človeka, ki so unikatne in specifično prisotne pri posameznikih, kot so na primer točkovne mutacije. Torej za analizo takšnih polimorfizmov moramo imeti zadostno koncentracijo DNA, ki pa nam jo zagotovi PCR (Powledge, 2004).

Vrednost »Touchdown PCR« se vidi predvsem, ko ne poznamo stopnje identitete med začetnim oligonukleotidom in matrično verigo. To se zgodi predvsem, ko se začetni oligonukleotidi izberejo na podlagi aminokislinskih zaporedij, ko se pomnožujejo zaporedja z več variacijami nukleotidnih baz. Večja kot je variabilnost zaporedja, večja je verjetnost nastanka nespecifičnih vezav (Roux, 2009).

»Touchdown PCR« (TD-PCR) hkrati predstavlja enostaven in hiter način pomnoževanja DNA, vendar s povečano specifičnostjo, občutljivostjo ter donosom. Začetna temperatura prileganja je nad temperaturo tališča (T_m) začetnih oligonukleotidov, nato pa postopoma pada skozi posamezen cikel do bolj običajne temperature prileganja. Razlika v T_m med pravilnim in nepravilnim prileganjem predstavlja dvakratno eksponentno izboljšavo pomnoževanja na cikel. TD-PCR se večinoma uporablja za matrice, ki jih je težje pomnoževati, ki pa jih zato lahko uporabimo za povečanje specifičnosti. Postopek poteka od 90 do 120 minut, odvisno od dolžine matrice ki jo pomnožujemo (Korbie in Mattick, 2008).

Torej je to vrsta metode PCR, pri kateri se začetni oligonukleotidi izogibajo pomnoževanju nespecifičnih zaporedij. Gre za nekakšno optimizacijo klasične metode PCR (Don in sod., 1991). Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov pri PCR določi specifičnost prileganja. Točka tališča začetnega oligonukleotida predstavlja zgornjo mejo temperature prileganja. Pri temperaturi malo pod to točko se zgodijo le določene specifične povezave med začetnim oligonukleotidom in matrično verigo. Pri še nižjih temperaturah se začetni oligonukleotidi vežejo manj specifično. Nespecifični začetni oligonukleotidi pa pokvarijo rezultat PCR (Korbie in Mattick, 2008). Zato imajo prvi koraki »Touchdown PCR« visoke temperature prileganja. Temperatura se nato znižuje za vsak cikel (število ciklov in znižanje temperature si določi raziskovalec sam). Začetni oligonukleotid prilega pri najvišji temperaturi, ki najmanj dovoljuje nespecifično vezavo. Tako je prvo pomnoženo zaporedje med regijo največje specifičnosti prileganja začetnega oligonukleotida. To je zaporedje, ki ga tudi sami iščemo. Te fragmenti se nato pomnožujejo pri nižjih temperaturah in nadomestijo nespecifična zaporedja, kamor bi se lahko pri nižjih temperaturah vezali začetni oligonukleotidi (Hecker in Roux, 1996). Pogoji cikliranja reakcije omogočajo pomnoževanje zelenega fragmenta brez povečanega tveganja za nastanek neželenih dimerov začetnih oligonukleotidov ali ampikonov. Čeprav temperatura prileganja sčasoma pade pod temperaturo T_m nespecifične hibridizacije, se tarčni ampikon že pomnoži toliko, da ga je več, kot kakšnih nespecifičnih produktov PCR, ki nastanejo v kasnejših ciklih. Cilj metode je v

bistvu izogibanje nastanka nespecifičnih produktov v začetnih ciklih pri nizkih temperaturah tališča T_m , zato je tudi nujno da se TD-PCR začne s korakom »Hot Start«. TD-PCR ni samo metoda za optimizacijo pogojev cikliranja za specifičen PCR, ampak lahko predstavlja potencialno metodo »one-step« za optimalno pomnoževanje (Roux, 2009).

S protokolom enostavnega »touchdown termocikliranja« smo tako signifikantno izboljšali specifičnost metode PCR v realnem času. Skupaj predstavljata homogeno in robustno metodo za genotipizacijo tranzicij ali transverzij polimorfizmov. Program padajoče temperature omogoča razlikovanje med pravilnimi in nepravilnimi alel-specifičnimi začetnimi oligonukleotidi ter tako poveča moč alel-specifične diskriminacije metode PCR (Wu in sod., 2005).

3.3.6.5 Princip sestavljanja protokola »Touchdown«

Cilj programiranja TD-PCR je ustvariti serije ciklov s postopno nižjo temperaturo naleganja. Temperatura prileganja naj bi predstavljala nekaj stopinj pa do 10 °C nad oziroma pod temperaturo T_m . Kontinuirana pojava nepravilnih produktov s TD-PCR nakazuje, da je prvotna temperatura prileganja prenizka, da obstaja le majhna vrzel med vrednostjo T_m tarčnih in nezaželenih amplikonov, ter da se neželeni amplikoni učinkoviteje pomnožujejo. Povečanje števila ciklov posameznega koraka na primer padajoče temperature za 1 °C na tri ali štiri, doda tarčnemu amplikonu dodatno kompetitivno prednost pred iniciacijo pomnoževanja napačnih amplikonov. Prav tako pa je potrebno odstraniti proporcionalno število ciklov pred koncem programa, da preprečimo preveliko pomnoževanje, hkrati degradacijo amplikona in nastanek visokomolekularnih produktov (Roux, 2009).

Modifikacije TD-PCR za uporabo z degeneriranimi in neustreznimi začetnimi oligonukleotidi vključujejo tudi znižanje niza temperatur prileganja (npr. iz 50 °C na 35 °C), medtem pa ohranimo zadnjih 15 ciklov na 50 °C. Ko se prične prileganje, so začetni oligonukleotidi

komplementarni novo nastalim amplikonom, imajo precej večjo T_m in nanje vpliva neugodno pretirano nizka temperatura prileganja (Roux, 2009).

3.3.6.6 Protokol

Naš postopek temelji na PCR v realnem času in merjenju fluorescence. Tako aparat za PCR v realnem času izvede reakcijo pomnoževanja DNA po protokolu »Touchdown«, na koncu pa izmeri fluorescenco, ki jo oddaja posamezen fluorofor pri sobni temperaturi 25 °C.

Na računalniškem programu za aparaturo za PCR v realnem času »LightCycler 480II« (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija) smo nastavili naš protokol TD-PCR, končni volumen reakcije 10 μ l ter označili branje ustreznih luknjic vzorcev (Slika 12). Posamezen vzorec smo delali v dveh ponovitvah.

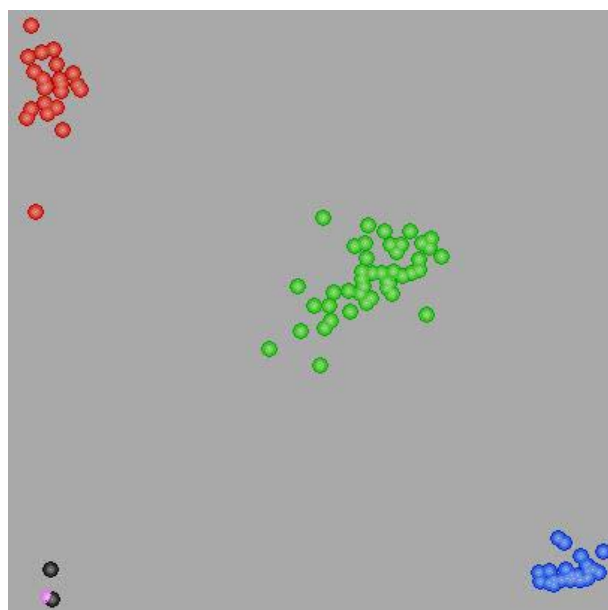


Slika 12: Sistem »LightCycler 480II« (Roche Applied Science, 2009b: 1).

V brezprašni komori smo nato odtalili vse reagente, potrebne za izvedbo genotipizacije. Za pripravo »master« reakcijske mešanice smo uporabljali standardne mikrocentrifugirke 1,5 ml. Že pripravljeno dvakratno reakcijsko mešanico za genotipizacijo smo premešali s pomočjo pipet, ker je raztopina dokaj viskozna. Odpipetirali smo ustrezen volumen v prazno mikrocentrifugirko, ki smo jo prej oblekli s standardno kuhinjsko alu folijo, ker svetloba škoduje flouoroforam. Ustrezno raztopino začetnega oligonukleotida smo premešali na vorteksnem mešalu 5 sekund, da smo dobili ekvivalentno razporeditev začetnih oligonukleotidov po celotni raztopini. Odpipetirali smo ustrezen volumen v mikrocentrifugirko z reakcijsko mešanico. Suspenzijo smo nato na hitro centrifugirali. Na posebnem pultu smo pripravili belo mikrotitrsko ploščico s 96 luknjicami in jo vstavili v poseben hladilni blok. V posamezno luknjico smo odpipetirali 5 μ l pripravljene suspenzije »master« reakcijske mešanice.

Pripravljeno mikrotitrsko ploščico v bloku smo prenesli v sobo z brezprašno komoro za pripravo vzorcev DNA. V komori smo pred nanosom vzorcev slednje premešali na vorteksnem mešalu, nato pa posamezen vzorec z volumnom 5 μ l odpipetirali v posamezno luknjico mikrotitirske ploščice. Končni volumen v posamezni luknjici je bil tako 10 μ l. Uporabili smo tudi pozitivno kontrolo za polimorfizem, ki smo jo dobili od proizvajalca. Kot negativno kontrolo smo uporabili destilirano vodo oziroma »DNA Free Water«. Odprtine ploščice smo nato zapečatili s samolepilno prozorno folijo.

Tako pripravljeno ploščico smo centrifugirali, da so se reagenti in vzorci lepo posedli na dno luknjic ploščice, ter jo nato vstavili v »LightCycler 480II« (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija). V računalniškem programu smo aktivirali analizo z gumbom START. Postopek PCR je trajal 1 uro in 40 minut. Po končani analizi ter branju fluorescence smo dobili rezultate v obliki grafa in tabele (Slika 13).



Slika 13: Prikaz rezultatov v obliki grafa, ki prikazuje 3 različne genotipe (homozigoti z alelom X in Y, heterozigoti z alelom XY) (KBioscience, 2011b: 7).

3.3.7 DOLOČANJE DOLŽINE POLIMORFIZMA GENA *IL-1RN*

Gen *IL-1RN* vsebuje spremenljivo število 86 baznih parov dolgih tandemskih ponovitev (VNTR). Izmed petih različnih je homozigotni alel 2 najredkejši in najpomembnejši za kronična vnetja, saj določa zmanjšano sintezo IL-1ra ter tako posledično spodbudi izražanje gena *IL-1B* in izločanje IL-1 β (El-Omar in sod., 2000). Zato smo pri tej metodi določevali genotip polimorfizmov *IL-1RN*, da bi potrdili njegovo vlogo vpliva na IL-1 β .

Začetne oligonukleotide smo izbrali glede na objave El-Omar in sodelavcev v članku z naslovom »Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer« objavljene v reviji Nature leta 2000. Zaporedja smo naročili pri podjetju TIB MOLBIOL (Syntheselabor GmbH, Berlin, Nemčija).

Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi za genotipizacijo *IL-1RN*

Začetni oligonukleotidi	Oligonukleotidna zaporedja
»FORWARD« – naprej	5'-CCCCTCAGCAACTCC-3'
»REVERSE« – nazaj	5'-GGTCAGAAGGGCAGAGA-3'

Začetne oligonukleotide smo dobili liofilizirane v tubicah. Nato smo jim po navodilih proizvajalca dodali 100 μ l dH₂O, da smo dobili začetno koncentraciji suspenzije 50 μ M. Ostale reagente, potrebne za izvedbo metode, smo naročili pri podjetju Qiagen (Hilden, Nemčija), in sicer dvakratno koncentracijo že pripravljene master reakcijske mešanice »HotStartTaq Plus« in deionizirano vodo oziroma vodo brez DNA (»DNA-free water«). Za pomnoževanje smo uporabili aparaturo »Thermocycler T3000« (Biometra, Göttingen, Nemčija) z naslednjim protokolom.

1) 95 °C 15 minut

2) 94 °C 30 sekund

3) 61 °C 30 sekund

4) 72 °C 60 sekund

Korake od 2 do 3 ponovimo 30-krat.

5) 72 °C 7 minut

3.3.7.1 Princip metode

Metoda temelji na pomnoževanju specifičnih ampikonov oziroma variabilnih tandemskih ponovitev s klasičnim PCR in na koncu na pregledu dolžine produktov z gelsko elektroforezo glede na označevalce znanih dolžin. Obstaja 5 različic alela, in sicer alel 1, ki nosi 4 ponovitve, alel 2 ima 2 ponovitvi, alel 3 ima 5 ponovitev, alel 4 ima 3 ponovitve in alel 5 ima

6 ponovitev (El-Omar in sod., 2000). Glede na število ponovitev so amplikoni različnih dolžin: 410, 240, 500, 325 in 595 baznih parov za posamezen alel (Highet in sod., 2010).

3.3.7.2 Postopek

Postopek določanja alela za gen *IL-1RN* sestoji iz dveh delov, in sicer iz pomnoževanja iskanega zaporedja ter nato določitvi polimorfizma za ta alel.

3.3.7.3 PCR

Dobljene liofilizirane začetne oligonukleotide smo najprej centrifugirali, da so se vsedli na dno tubice. Razredčili smo jih po navodilih proizvajalca, da smo dobili 50 μ M koncentracijo in še enkrat centrifugirali. Končna koncentracija začetnih oligonukleotidov za izvedbo PCR je bila 10 μ M, ki smo jo dobili tako, da smo zmešali 10 μ l začetnih oligonukleotidov z začetno koncentracijo 50 μ M z 40 μ l vode brez DNA. »Master« reakcijsko mešanico smo pripravili tako, da smo zmešali ustrezen volumen dvakratne koncentracije reakcijske mešanice »HotStartTaq Plus« z začetnimi oligonukleotidi in destilirano vodo (ddH₂O), da smo dobili enkratno koncentracijo reakcijske mešanice. Za posamezen vzorec smo tako zmešali 12,5 μ l dvakratne reakcijske mešanice, 0,75 μ l posameznega začetnega oligonukleotida s koncentracijo 10 μ M, 8,5 μ l ddH₂O in 2,5 μ l vzorca z DNA. Končni volumen je bil 25 μ l. Mikrocentrifugirke smo na kratko centrifugirali ter jih dali v aparaturo za PCR. Nastavili smo program in izvedli protokol.

3.3.7.4 Elektroforeza

Za določitev polimorfizma smo pripravili 1,5-odstotni agarozni gel. Natehtali smo 3 g agaroze v prahu (Sigma-Aldrich, St. Louise, ZDA) in stresli v erlenmajerico. Dodali smo 200 μ l pufra 1x TAE s vrednostjo pH=8,3 (48,45 g baze Tris, 3,72 g EDTA, 1000 ml destilirane vode), dobro premešali in kuhali v mikrovalovni pečici nekaj minut, da se je agarosa raztopila. Po

kuhanju smo počakali, da se je raztopina ohladila. Dodali smo 13 μ l etidijevega bromida (10 g/ml) in dobro premešali. Nato smo pripravili nosilec za gel z ustreznim glavnikom in ga uravnovesili. Raztopino agaroze smo razlili v nosilec in počakali da polimerizira oziroma se strdi. Nosilec smo vstavili v elektroforezno banjico. Odstranili smo glavniček. V elektroforezno banjico smo nalili še pufer TAE, tako da smo prelili celoten gel in da je bil potopljen v pufer.

Na parafilm smo za posamezen vzorec nanesti 2 μ l barvila in pomešali z vzorcem DNA volumna 10 μ l. Mešanico vzorca in barvila smo vnesli v jamico agaroznega gela. V gel smo vnesli tudi 3 μ l raztopine fragmentov DNA znanih velikosti (DNA označevalec velikosti 1 kb) z 1 kb lestvico. Elektroforezno banjico smo priključili v električno polje jakosti 140 V za dobrih 45 minut. Po končani elektroforezi smo gel analizirali ob obsvetitvi z UV in ga fotografirali.

3.3.8 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Za statistično obdelavo smo uporabljali program »IBM SPSS Statistics 19« (IBM, New York ZDA). Vsem lokusom smo izračunali skladnost s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem (HWE). Z njim smo določili ali je v naših genih prišlo do evolucije oziroma spremembe frekvence alelov z vsako nadaljnjo generacijo. Za ohranitev Hardy-Weinbergovega ravnovesja so potrebne naslednje lastnosti populacije:

- V populaciji ne sme biti mutacij, da se ne pojavijo novi aleli.
- Ni prehoda genov oziroma migracij posameznikov v ali iz populacije.
- Parjenje vseh posameznikov je naključno in vsi posamezniki imajo enako število potomcev.
- Populacija mora biti velika, da sprememba gena ne povzroča spremembe frekvence alelov.
- Ni prisotne naravne selekcije, da se ne nakopiči samo en alel.

Hardy-Weinbergovo ravnovesje zaradi lastnosti populacije ne more obstajati v resničnem življenju, ker vsi ti dejavniki vplivajo na populacijo skozi evolucijo. Enačba nam omogoča določiti frekvence alelov, ki so se spremenili skozi generacije in ali se je zgodila evolucija. Hardy-Weinbergovo ravnovesje izračunamo po dveh enačbah:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$p + q = 1$$

p = frekvenca dominantnega alela v populaciji

q = frekvenca recesivnega alela v populaciji

p² = odstotek homozigotnih dominantnih posameznikov

q² = odstotek homozigotnih recesivnih posameznikov

2pq = odstotek heterozigotnih posameznikov

Opravka smo imeli z opisnimi spremenljivkami, zato smo primerjavo pogostosti polimorfizmov med skupino primerov in kontrol izvedli s pomočjo statistične analize hi-kvadrat (χ^2). Gre za test, kjer preverimo odvisnost dveh opisnih spremenljivk (Bowers, 2007). Pearsonov test hi-kvadrat je primeren za določevanje deviacij principa HWE, kjer imamo opravka z opazovanimi frekvencami genotipov, ki jih pridobimo iz podatkov, in pričakovanimi frekvencami iz enačbe za HWE. Ničelna hipoteza trdi, da je populacija v HWE, medtem ko alternativna pravi, da populacija ne ustreza HWE.

Hardy-Weinbergovo ravnovesje in izračun frekvenc alelov:

$$p = \frac{2 \times \text{opaz. (AA)} + \text{opaz. (Aa)}}{2 \times (\text{opaz. (AA)} + \text{opaz. (Aa)} + \text{opaz. (aa)})}$$

$$q = 1 - p$$

Hardy–Weinbergove pričakovane vrednosti:

$$\text{Pril. (AA)} = p^2 n$$

$$\text{Pril. (Aa)} = 2pq n$$

$$\text{Pril. (aa)} = q^2 n$$

Pearsonov test χ^2 :

$$\frac{(O - E)^2}{E}$$

O = opazovane vrednosti frekvenc (angl. observed)

E = pričakovane vrednosti frekvenc (angl. expected)

Stopnja prostosti za HWE se izračuna kot od števila genotipov odšteto število alelov. Pri 5-odstotni stopnji značilnosti je stopnja prostosti 3,84. V kolikor je vrednost testa χ^2 manjša kot to, se ničelna hipoteza, da so frekvence populacije v HWE, sprejme.

4 REZULTATI

Z diplomskim delom smo hoteli ugotoviti kako polimorfizem genov za vnetni citokin IL-1 β in njegov antagonist IL-1ra vpliva na nastanek raka pri bolnikih s kronično okužbo z bakterijo *H. pylori*, ter tako določiti skupino ljudi z največjim tveganjem za razvoj raka želodca. V raziskavo smo vključili bolnike z diagnosticiranim gastritisom oziroma adenokarcinomom želodca. Za primerjavo skupin smo kot kontrole vzeli skupino zdravih krvodajalcev.

Pri skupinah bolnikov smo ovrednotili bolezen glede na histopatološke izvide in nato določili okužbo z bakterijo *H. pylori*. Pri vseh smo iz krvi izolirali DNA in potem določili prisotne variante gena za IL-1 β ter prisotnost določenih alelov za antagonist IL-1ra. Dobljene rezultate za določene polimorfizme smo statistično opredelili kot opisne spremenljivke in jih ovrednotili s statistično analizo χ^2 . Določili smo tudi Hardy-Weinbergovo ravnotežje alelov in preverili naše delovne hipoteze.

4.1 OVREDNOTENJE SKUPIN

Pri epidemiološki študiji primerov s kontrolami smo preiskovali bolnike s kroničnim gastritisom oziroma diagnosticiranim rakom želodca, zato smo glede na njihove osnovne podatke izbrali skupino kontrolnih preiskovancev. V preglednici 4 so prikazani osnovni podatki ljudi, vključenih v študijo, ki smo jih lahko objavili. Skupaj je bilo v raziskavo vključenih 296 oseb, izmed katerih smo jih potem 109 zaradi neustreznosti podatkov ali diagnoze izključili. Glede na število primerov je bila zaradi boljše statistične moči izbrana dvakratna velikost skupine kontrol. Povprečna starost posameznikov je bila primerljiva v vseh skupinah. Izbrani so bili enaki deleži posameznikov glede na spol, in sicer 0,50.

Preglednica 4: Število in deleži posameznikov, vključenih v študijo.

Diagnoza	Z rakom	Z gastritisom	SKUPAJ	Zdravi	SKUPAJ
Število preiskovanih	37	59	96	200	296
Povprečna starost	57	58	57,5	49	/
Število moških	27	21	48	100	148
Število žensk	10	38	48	100	148
Delež moških (%)	73	36	50	50	100
Delež žensk (%)	27	64	50	50	100

S pomočjo že opravljenih histopatoloških preiskav smo bolnike razvrstili v posamezni skupini primerov – z rakom ali z gastritisom. Pri skupini z gastritisom smo preverjali pravilnost odvzema biopsičnih vzorcev želodca, ali je prisotno vnetje, atrofija sluznice, metaplazija in *H. pylori*. Ustrezne izvide bolnikov iz skupine z gastritisom smo potem ocenili po Sydneyski klasifikaciji in gradaciji gastritisov in jih vključili v statistično analizo. Neustrezne bolnike s prisotno metaplazijo oziroma z morebitnimi nepopolnimi izvidi smo izključili iz študije.

Pri skupini rakavih bolnikov smo opredelili tip raka, torej ali je šlo za intestinalni, difuzni oziroma atipični (neopredeljeni) karcinom. Določili smo njihove graduse in klasifikacijo TNM. Preverjali smo tudi prisotnost bakterije *H. pylori*. Bolnike z neopredeljeno diagnozo raka smo izključili iz statistične analize.

V preglednici 5 je število vseh preiskovancev, ki smo jih vključili v širši izbor in določevali status diagnoze. Iz dobljenih rezultatov vseh preiskav smo v končni izbor in statistično analizo vključili le posameznike, ki so ustrezali začetnim kriterijem opredelitve gastritisov oziroma rakov.

Preglednica 5: Število vseh analiziranih posameznikov iz skupine primerov.

Diagnoza	Z rakom			Z gastritisom			Kontrole
	intestinalni	difuzni	neopredeljen	gastr.	gastritis atrofija	gastritis metaplazija	
SPOL							
M	15	7	2	14	5	2	100
Ž	6	1	2	20	11	7	100
Σ	21	8	4	34	16	9	200
HP izvidi	/	/	/	18	14	8	/
KULTURA							
HP kult. P	/	/	/	27	15	8	/
HP kult. N	/	/	/	4	1	1	/
HP kult. ND	/	/	/	3	0	0	/
SEROLOGIJA							
IgG P	6	3	3	/	/	/	/
IgG E	5	2	1	/	/	/	/
IgG N	10	3	0	/	/	/	/
GENOTIP.							
IL-1 β -511							
CC	7	3	0	18	10	3	78
CT	11	5	3	14	4	5	106
TT	3	0	1	2	2	1	16
IL-1RN							
1/1	11	5	2	21	11	4	117
1/2	9	3	2	12	3	4	63
2/2	1	0	0	0	2	1	20

Legenda:

Gastr. - gastritis, HP kult. - *H. pylori* kultura, P - pozitivno, N - negativno, ND - neznano, Genotip. - genotipizacija.

4.2 KULTURA

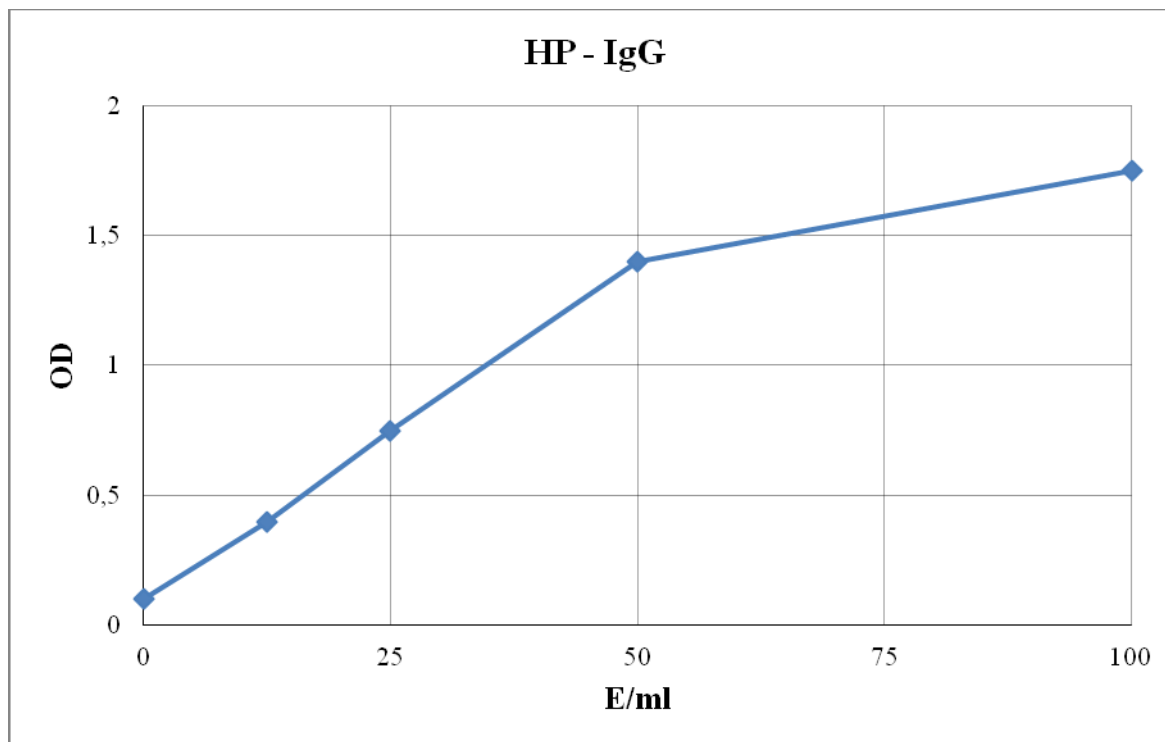
Za potrditev okužbe z bakterijo *H. pylori* smo pri bolnikih z gastritisom v Laboratoriju za diagnostiko anaerobnih in aerobnih bakterijskih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo preverili prisotnost bakterije v bioptičnih vzorcih želodcev, ki smo jih ustrezno obdelali in nacepili na selektivna gojišča za rast bakterije. Rast in s tem okužbo smo potrdili pri veliki večini posameznikov. Pri statistični analizi smo tako lahko vzeli v obzir prisotnost bakterije pri bolnikih z gastritisom. Pri treh bolnikih nismo imeli podatkov o kulturi.

4.3 SEROLOGIJA

Pri rakavih bolnikih smo s serološkim testom ELISA-HP IgG proti *H. pylori* potrdili okužbo z bakterijo. Imeli smo 37 vzorcev serumov bolnikov z diagnosticiranim rakom. Posamezen vzorec smo testirali v dvojniku. Pri vsaki izvedbi testa smo uporabljali pozitivno in negativno kontrolo, ter pet referenčnih serumov (označeni so od 1 do 5). V prvi koloni smo nanašali obvezne standarde ter kontrole, in sicer prva jamica je ostala prazna (blank), jamice od B1 do F1 so predstavljali standardni kalibratorji 1 do 5. G1 je bila negativna kontrola, H1 pa pozitivna kontrola.

Slika 14 prikazuje koncentracijo protiteles IgG testa ELISA proti *H. pylori* v odvisnosti od optične gostote. Sklepamo lahko, da je bil test pravilno izveden, saj vidimo, da se s povečano optično gostoto veča tudi koncentracija protiteles proti *H. pylori*. Gre za standardno krivuljo, ki so pri testih ELISA ključni za boljšo orientacijo pravilnosti rezultatov.

Pravilnost rezultatov lahko preverimo tudi z referenčnimi in kritičnimi vrednostmi standardov in kontrol. OD kalibratorja 1 mora biti manj kot 0,2. Negativna kontrola mora imeti manj kot 10 enot/ml, pozitivna kontrola pa mora imeti med 25 in 50 enot/ml.



Slika 14: Koncentracija IgG protiteles proti *H. pylori* v serumu pri rakavih bolnikih v enotah na mililiter (E/ml), v odvisnosti od optične gostote pri 450 nm (absorbanca, OD).

Rezultat ovrednotimo kot:

- pozitiven: če je v vzorcu enako ali več kot 20 enot/ml protiteles proti bakteriji *H. pylori*,
- negativen: če je v vzorcu enako ali manj kot 12,5 enot/ml protiteles proti bakteriji *H. pylori*,
- nejasen: če so vrednosti vmesne. V takšnih primerih je ponavadi treba bolniku odvzeti vzorec ponovno po 14 dneh.

Test GAP IgG je kvantitativni test za detekcijo prisotnosti specifičnih protiteles proti *H. pylori* in ne napove titra protiteles. Z njim lahko le potrdimo okužbo z bakterijo. Slednjo smo potrdili pri večini rakavih bolnikov.

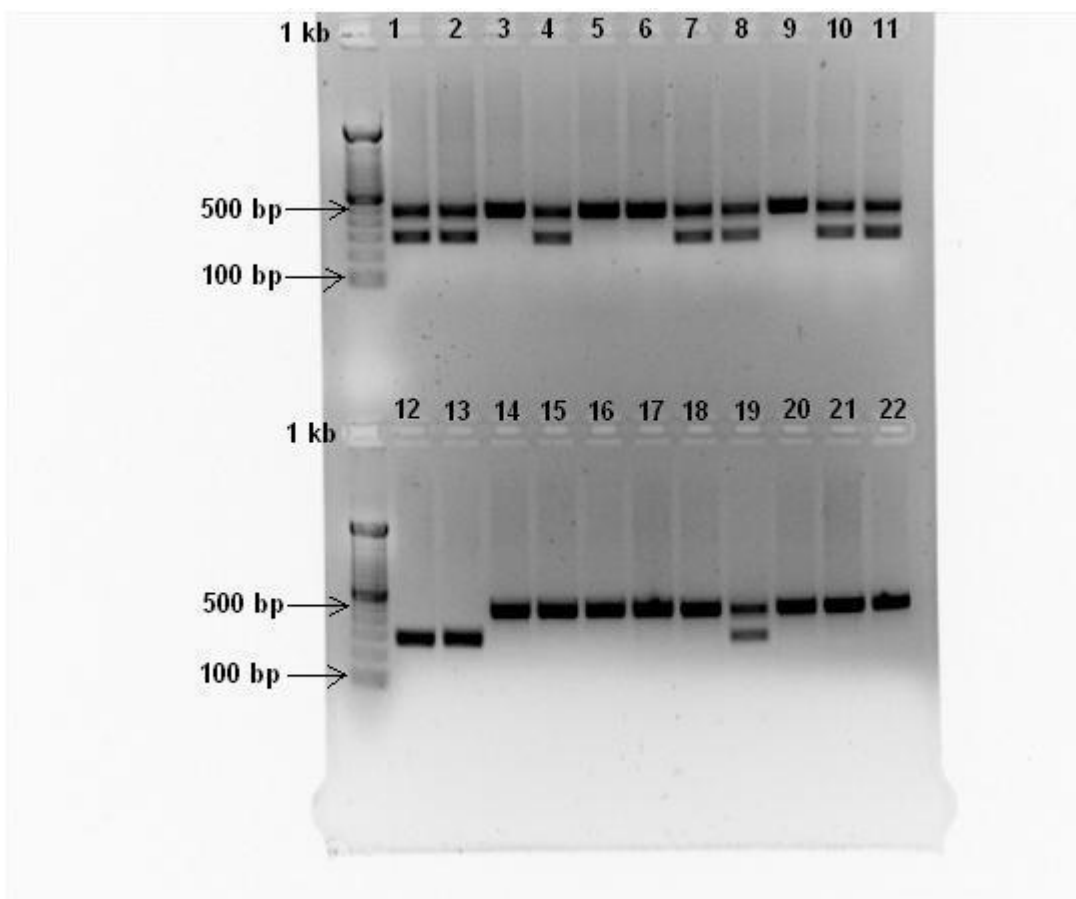
Vendar pa pozitiven rezultat testa ne razlikuje med kolonizacijo ali infekcijo s *H. pylori*, niti ne kaže na morebitno bolezen gastrointestinalnega trakta. Zato ni potrebno testirati asimptomatskih bolnikov, saj mehanizem *H. pylori*, s katerim povzroča bolezen, še ni povsem poznan. Bakterija lahko preživi v sluznici več let. *H. pylori* je pogost tudi pri posameznikih, ki so zdravi in ne kažejo kliničnih znakov bolezni.

Osebe nad 50 let starosti imajo večjo verjetnost, da so se v preteklosti že srečale z bakterijo in imajo lahko nižji, ampak še zaznaven titer protiteles proti *H. pylori* brez kliničnih znakov. Incidenca seropozitivnosti pa lahko variira med populacijami.

Povprečna starost rakavih bolnikov z negativnim rezultatom je 56 let, povprečna starost negativnih in nejasnih rezultatov bolnikov je prav tako 56 let. Torej lahko sklepamo, da so se morebiti bolniki že srečali z bakterijo v prejšnjih letih, in da titer protiteles s starostjo upada, saj s starostjo peša imunski odziv na različne agense.

4.4 GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMOV

Del gena *IL-1RN* smo pomnožili s PCR in nato produkte preverili v 1,5-odstotnem agaroznem gelu z gelsko elektroforezo. Določevali smo število in velikosti variabilnih tandenskim ponovitev velikih 86 baznih parov. Slika 15 prikazuje enega izmed gelov, v katerem smo preverjali dolžino alelov. Črne lise pomenijo uspešno pomnožen produkt, ki se v gelu razporedijo po velikost. Alel, ki ga iščemo je najkrajši in ima dve tandenskim ponovitivi regij s 86 bp, tako da mora biti dolg 240 bp.



Slika 15: Primer enega izmed gelov za določevanje dolžine alelov za *IL-1RN* z gelsko elektroforezo.

Legenda:

Prva dva stolpca predstavljata standardno DNA z 1 kb lestvico za določevanje dolžine alelov.

1 do 22 predstavljajo delež testiranih vzorcev.

1, 2, 4, 7, 8, 10, 11, 19 - primeri heterozigotov za kratek in dolgi alel.

3, 5, 6, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22 - homozigoti za dolge alele.

12 in 13 - iskani homozigoti z dvema tandenskim ponovitvama za najkrajši alel *IL-1RN**2/2, dolg 240 bp.

Za *IL-1 β* smo izvedli genotipizacijo s PCR v realnem času. V preglednici 8 so zbrani deleži posameznih genotipov, ki smo jih nato vključili v statistično analizo. Neustrezne bolnike smo

izključili iz nadaljnje analize bodisi zaradi napačne začetne diagnoze oziroma neuspele genotipizacije.

Preglednica 8: Deleži genotipov preiskovancev, vključenih v statistično analizo.

Bolniki	Z rakom (n=29)	Z gastritisom (n=50)	Kontrole (n=108)	SKUPAJ (n=187)
IL-1β*-511				
C/C	10 (34,5 %)	28 (56,0 %)	42 (38,9 %)	80 (42,8 %)
C/T	16 (55,2 %)	18 (36,0 %)	52 (48,1 %)	86 (46,0 %)
T/T	3 (10,3 %)	4 (8,0 %)	14 (13,0 %)	21 (11,2 %)
manjka	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
SKUPAJ	29	50	108	187
IL-1RN				
1/1	16 (55,2 %)	32 (65,3 %)	63 (58,3%)	111 (59,7 %)
1/2	12 (41,4 %)	15 (30,6 %)	32 (29,6%)	59 (31,7 %)
2/2	1 (3,4 %)	2 (4,1 %)	13 (12,1%)	16 (8,6 %)
manjka	0 (0 %)	1 (2,0 %)	0 (0%)	0 (0 %)
SKUPAJ	29	49	108	186

4.5 STATISTIČNA ANALIZA

Statistično analizo smo naredili s programom »IBM SPSS Statistics 19«, kjer smo izračunali posamezne deleže genotipov za določen polimorfizem. Naredili smo navzkrižne tabele 2x2, da bi lahko preverili, ali sta določeni spremenljivki odvisni oziroma neodvisni, ter primerjali posamezne skupine med seboj in tako določili skupino ljudi, ki imajo največje tveganje za razvoj raka želodca. Vrsta predstavlja eno spremenljivko, kolona pa drugo. Ničelna hipoteza je, da spremenljivki nista v povezavi (Bowers, 2007). Izračunali smo statistično analizo χ^2 (hi-kvadrat), ter glede na izračun potrdili ali ovrgli našo ničelno hipotezo (preglednice 9, 10, 11).

Za analizo smo vzeli 95-odstotni interval zaupanja, kjer je stopnja značilnosti α enaka 0,05. S tem lahko z gotovostjo trdimo, da so rezultati naših vzorcev v 95 % pravilni. Če je bila p-

vrednost statistične analize χ^2 manj kot 0,05, smo zavrnili ničelno hipotezo in zaključili, da sta spremenljivki odvisni oziroma je v posameznih skupinah prisotna statistično pomembna razlika v deležih. S tem smo potrdili našo delovno hipotezo, da določen polimorfizem poveča tveganje za razvoj raka. V primeru, da je bila p-vrednost analize χ^2 večja kot stopnja značilnosti 0,05, smo sprejeli ničelno hipotezo in dokazali, da ni medsebojne povezave med spremenljivkama.

Preglednica 9: Frekvence genotipov za IL-1 β na mestu -511 in IL-1RN ter primerjava 29 rakavih bolnikov in 50 bolnikov z gastritisom.

Bolniki	VSI (n=79)	Z rakom (n=29)	Z gastritisom (n=50)	Z rakom / Z gastritisom	Pearsonov χ^2 (IZ=95 %)	p ($\alpha=0,05$)
IL-1β*-511						
CC	38 (48,1 %)	10 (34,5 %)	28 (56,0 %)	3,404		0,065
CT	34 (43,0 %)	16 (55,2 %)	18 (36,0 %)	2,752		0,097
TT	7 (8,9 %)	3 (10,3 %)	4 (8,0 %)	0,125		0,724
IL-1RN						
1/1	48 (61,5 %)	16 (55,2 %)	32 (65,3 %)	0,790		0,374
1/2	27 (34,6 %)	12 (41,4 %)	15 (30,6 %)	0,933		0,344
2/2	3 (3,8 %)	1 (3,4 %)	2 (4,1 %)	0,020		0,888

Preglednica 10: Frekvence genotipov za IL-1 β na mestu -511 in *IL-1RN* ter primerjava 29 rakavih bolnikov in 108 posameznikov iz kontrolne skupine.

Bolniki	VSI (n=137)	Z rakom (n=29)	Kontrole (n=108)	Z rakom / Kontrole	
				Pearsonov χ^2 (IZ=95 %)	p ($\alpha=0,05$)
IL-1β*-511					
CC	52 (38,0 %)	10 (34,5 %)	42 (38,9 %)	0,188	0,664
CT	68 (49,6 %)	16 (55,2 %)	52 (48,1 %)	0,451	0,502
TT	17 (12,4 %)	3 (10,3 %)	14 (13,0 %)	0,144	0,704
IL-1RN					
1/1	79 (57,7 %)	16 (55,2 %)	63 (58,3 %)	0,094	0,760
1/2	44 (32,1 %)	12 (41,4 %)	32 (29,6 %)	1,448	0,229
2/2	14 (10,2 %)	1 (3,4 %)	13 (12,0 %)	1,838	0,175

Preglednica 11: Frekvence genotipov za IL-1 β na mestu -511 in *IL-1RN* ter primerjava 50 bolnikov z gastritisom in 108 posameznikov iz kontrolne skupine.

Bolniki	VSI (n=158)	Z gastritisom (n=50)	Kontrole (n=108)	Z gastritisom / Kontrole	
				Pearsonov χ^2 (IZ=95 %)	p ($\alpha=0,05$)
IL-1β*-511					
CC	70 (44,3 %)	28 (56,0 %)	42 (38,9 %)	4,055	0,044
CT	70 (44,3 %)	18 (36,0 %)	52 (48,1 %)	2,044	0,153
TT	18 (11,4 %)	4 (8,0 %)	14 (13,0 %)	0,834	0,361
IL-1RN					
1/1	95 (60,5 %)	32 (65,3 %)	63 (58,3 %)	0,686	0,408
1/2	47 (29,9 %)	15 (30,6 %)	32 (29,6 %)	0,160	0,901
2/2	15 (9,6 %)	2 (4,1 %)	13 (12 %)	2,469	0,116

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

H. pylori kolonizira človeški želodec in vzpostavi dolgo trajajočo okužbo sluznice želodca. Okužba sproži najprej kronični aktivni gastritis, ki se lahko razvije preko kroničnega atrofičnega gastritisa do intestinalne metaplazije in displazije ter kasneje do raka želodca. Kljub temu pa se ta proces pojavi le pri deležu okuženih bolnikov, tako da je odvisen od bakterijskih kot tudi gostiteljevih genetskih dejavnikov (Machado in sod., 2002).

IL-1 β je sprožilec hipoklorhidrije in ojačevalec imunskega odziva. Antagonist receptorja za IL-1 (*IL-1RN*) je protivnetni citokin, ki tekmuje za receptor IL-1 in tako uravnava delovanje IL-1 β . Študije na kavkazijskih in azijskih populacijah so pokazale, da so polimorfizmi v genih *IL-1B* in *IL-1RN* v povezavi s povečanim tveganjem za hipoklorhidrijo in karcinomom želodca (Barbosa in sod., 2009).

Machado in sodelavci (2002) so odkrili povečano tveganje za rak želodca pri nosilcih alela *IL-1B* -511*T, ki so homozigoti za alel *IL-1RN**2 z razmerji obetov 3,3 (OR=3,3). Dokazali so tudi, da nosilci *IL-1B* -511*T in homozigoti *IL-1RN**2 razvijejo resnejši gastritis, s tem se misli večje vnetje v predelu korpusa, poškodbe epitelija v korpusu in antrumu in prisotnost glandularne atrofije. Rezultati dajejo posreden dokaz vpliva povišanega vnetja pri nosilcih z aleli *IL-1B* -511*T in *IL-1RN**2. Hkrati pa povezava med povečanim vnetjem v korpusu in genotipom IL-1 ustreza vzorcu gastritisa s *H. pylori* sproženo karcinogenezo želodca; gastritis z vplivom izločanja kisline v korpusu vodi do hipoklorhidrije, atrofije želodca in povečanega tveganja za nastanek raka želodca. Nasprotno pa gastritis v antralnem delu želodca vodi do povečane produkcije kisline in višjega tveganja za duodenalne razjede (Machado in sod., 2002).

Zaključili so, da je obširnost poškodbe sluznice odvisna od seva bakterije, vnetnega odziva gostitelja in interakcij med gostiteljevimi in bakterijskimi dejavniki. Kombinacija teh vodi do hipoklorhidrije, atrofije korpusa in povečanega tveganja za razvoj raka (Machado in sod., 2002).

V prejšnjih študijah so dokazali, da več različnih simultanih genotipov v genih za vnetne citokine izredno poveča tveganje za razvoj raka želodca pri takšnih bolnikih. Zato smo hoteli z analizo polimorfizmov genov za IL-1 β in IL-1ra preveriti hipotezo, da določeni polimorfizmi vplivajo na povečano tveganje za razvoj raka želodca pri bolnikih s kronično okužbo s *H. pylori*. Hoteli smo identificirati tisto skupino posameznikov, ki bi imela povečano tveganje za razvoj raka želodca, da bi tako lahko ukrepali na preventivnem področju razvoja bolezni. Raziskali smo vpliv dveh vnetnih citokinov pri različnih skupinah ljudi in dokazali, da prisotnost določenega genotipa gena za vnetni citokin ni uporabna za identifikacijo ljudi s povečanim tveganjem za nastanek raka želodca. So pa rezultati naše študije pokazali, da okužba s *H. pylori* pri določenem vnetnem genotipu *IL-1B* povzroči povečan vnetni odgovor, ki nato vodi v razvoj gastritisa.

5.1.1 Izbira ustreznih preiskovancev in vzorcev

V študijo smo vključili preiskovani skupini ljudi; skupino bolnikov z diagnosticiranim rakom in skupino bolnikov z diagnosticiranim gastritisom, izmed katerih smo iskali posameznike s povečanim tveganjem za razvoj raka. Rezultati so temeljili na pregledu patohistoloških izvidov, s katerimi smo posameznike razvrstili v posamezne skupine. Glede na njihove osnovne podatke smo izbrali ustrezno kontrolno skupino zdravih krvodajalcev. Razlik med preiskovanima skupinama ni bilo, saj so imeli vsi diagnosticirano okužbo s *H. pylori*, povprečna starost je bila 58 let, delež moških in žensk je bil 0,50 (preglednica 4).

Okužbo s *H. pylori* smo potrdili na dva načina: pri bolnikih z gastritisom smo po odvzemu vzorca izvedli kultivacijo bakterije. Rast smo dokazali pri skoraj vse preiskovancih. Pri bolnikih z rakom smo določili prisotnost protiteles IgG proti *H. pylori* (slika 14, preglednici 6 in 7). Vsi serološki rezultati niso bili pozitivni. Nejasne rezultate (vrednosti med 12,5 enot/ml in 20 enot/ml protiteles) smo kljub temu opredelili kot pozitivne. To razložimo lahko tako, da negativen rezultat ne izključuje prisotnosti bakterije, ampak je lahko prisotna kolonizacija, toda šele v zgodnji fazi oziroma je titer protiteles prenizek, da bi jih test lahko zaznal. Prav tako imajo osebe nad 50 let starosti večjo verjetnost, da so se v preteklosti že srečali z bakterijo in imajo posledično še zaznaven titer specifičnih protiteles proti *H. pylori*. Povprečna starost rakavih bolnikov z negativnim rezultatom je 56 let, povprečna starost bolnikov z negativnimi in nejasnimi rezultati bolnikov prav tako 56 let. Torej lahko sklepamo, da so se morebiti bolniki že srečali z bakterijo v preteklosti. Bolniki z rakom so večinoma seronegativni. Enkrat ko je že razvit rak želodca, bakterije ni več prisotne v želodcu, zato ne proizvajajo protiteles proti bakteriji in titer protiteles pade. Je pa znano tudi, da titer protiteles s starostjo upada, saj s starostjo peša imunski odziv na različne agense.

Vse preiskovance z gastritisom smo opredelili s Sydneysko klasifikacijo in gradacijo gastritisov ter jih glede na ustreznost naprej uvrstili v analizo. Preverjali smo pravičen odvzem bioptičnega vzorca želodca in ugotovili, da so vsem bolnikom pravilno odvzeli 3 do 5 vzorcev. Kot mejo za pravičen odvzem smo določili, da morata biti odvzeta vsaj 2 vzorca, in sicer vzorec korpusa in vzorec antruma. Določevali smo tudi stopnjo gastritisa, ali je prisotno vnetje, atrofija sluznice, metaplazija in prisotnost bakterije *H. pylori* (preglednica 5). Pri bolnikih z rakom smo opredelili tip raka, določili njihove graduse in klasifikacijo TNM (velikost tumorja, vpletenost limfnih vozlov, prisotnost metastaz). Rezultati so bilo povsem raznoliki, zato smo vse bolnike vključili v nadaljnjo analizo.

Pri skupini bolnikov z diagnosticiranim rakom je bilo potrebno določiti tipe rakavih obolenj, saj sta prisotnost okužbe s *H. pylori* in določenega polimorfizma gena za citokine pomembna

za razvoj adenokarcinoma želodca (intestinalni in difuzni tip), medtem ko ostali histološki tipi rakov nimajo povezave z genotipi vnetnih citokinov. V preglednici 5 so zbrani rezultati patohistoloških izvidov, ki prikazujejo število bolnikov z določenim tipom raka in število bolnikov z gastritisom. V študijo smo tako vključili le posameznike z diagnosticiranim intestinalnim in difuznim tipom raka, ter posameznike z gastritisom in gastritisom z atrofijo. Bolniki ki niso imeli ustrezne diagnoze, se pravi drugačen ali neopredeljen tip raka, so bili izključeni iz statistične analize. Enako velja za bolnike z gastritisom, ki ga spremlja metaplazija želodca, saj je to stanje, ki predisponira oziroma vodi do karcinoma (Manxhuka-Kerliu in sod., 2009), kar ni bilo v skladu z našo delovno hipotezo.

Na koncu smo v statistično analizo vključili 187 oseb, in sicer 29 bolnikov z diagnosticiranim adenokarcinomom želodca, 50 bolnikov z diagnosticiranim gastritisom. Za kontrolo smo v analizo vključili 108 zdravih oseb.

5.1.2 Določanje genotipov v genih za vnetne citokine

Vsem preiskovancem smo določili genotipe v genih za vnetna citokina IL-1 β in IL-1ra. Iz vzorcev krvi smo izolirali njihovo DNA. Vzorce smo nato uporabili za PCR in PCR v realnem času z merjenjem fluorescence.

Genotip gena *IL-1B* smo določevali na mestu -511 s PCR v realnem času, kjer smo na koncu reakcije merili fluorescenco vezanega barvila. Določena fluorescenca je predstavljala določen genotip C oziroma T. V kolikor sta svetili obe barvili, je šlo za heterozigotni genotip s C/T. Rezultati so bili v skladu z Hardy-Weinbergovim ravnovesjem, saj je bila frekvenca dominantnega alela s C precej večja kot frekvenca recisivnega alela s T in stopnja prostosti je bila manjša kot 3,84. Pri rakavih bolnikih in bolnikih z gastritisom smo pričakovali čim večje število alela s T, pri kontrolnih posameznikih pa predvsem alel s C. Deleži genotipov so prikazani v preglednici 8. Dobili smo izredno majhen delež iskanih genotipov *IL-1B* -511*T/T

pri vseh treh proučevanih skupinah; približno 8 do 13 % vseh preiskovanih. Delež genotipa *IL-1B* -511*C/C je bil največji pri skupini z gastritisom, 56 % vseh preiskovanih bolnikov z gastritisom, pri rakavih bolnikih je bil ta odstotek nižji, in sicer 34,5 %. Pri kontrolah je frekvenca genotipa s C/C 38,9 %. Tu smo že iz deležev videli trende, da nosijo bolniki z gastritisom predvsem alel s C, medtem ko so rakavi bolniki po deležu podobni skupini kontrol. Dobili smo precej velik delež heterozigotov, 46 % vseh preiskovanih, ki so hkrati tudi nosilci alela s T. Hardy-Weingergovo načelo trdi, da mora biti delež heterozigotnosti v populaciji 50 %. Pri skupini z rakom in kontrol je ta delež dokaj podoben, saj smo identificirali 55,2 % heterozigotov pri skupini z rakom in 48,1 % pri kontrolah. Pri skupini z gastritisom je delež 36 %. V naravi Hardy-Weinbergovo ravnovesje načeloma ni mogoče, saj vedno deluje kakšen od motečih dejavnikov (mutacije, migracije v populaciji,...) in predpostavke skoraj nikoli niso izpolnjene. Hardy-Weinbergovo načelo torej predstavlja teoretično osnovno stanje napram kateremu vrednotimo odstopanja.

Alelne polimorfizme *IL-1RN* oziroma dolžine VNTR smo preverjali z agarozno elektroforezo. Iskane alele vzorcev DNA smo pomnožili s klasično PCR in nato produkte preverjali v 1,5 % agaroznem delu (slika 15). Zanimal nas je predvsem alel dolžine 240 bp, kjer gre za ponovitev dveh VNTR dolžine 86 bp. Iskali smo homozigotni genotip *IL-1B**2/2, ki naj bi bil, po študijah sodeč, povezan s povečano ekspresijo gena za IL-1 β in tako s povečanim vnetjem in hipoklorhidrijo. V populaciji je prisotnih 5 različno dolgih alelov, zato smo jih za boljšo predstavljivost razdelili v dve skupini. Iskani najkrajši alel smo ovrednotili kot S (angl. short allele) in ostale kot L (angl. long allele). Presenetljivo smo dobili največji delež kratkih alelov pri zdravi skupini kontrolnih oseb, in sicer 12,1 %. Pri skupini z gastritisom je delež iskanega alela 4,1 %, pri rakavih bolnikih pa 3,4 %. S tako nizkim deležem bi lahko že zavrnilo začetno delovno hipotezo za IL-1ra. Pri vseh preiskovancih smo našli 31,7 % nosilcev kratkega alela. Ti naj bi prav tako predstavljali osebe s povečanim tveganjem, saj smo v skupini z rakom dokazali 41,4 % heterozigotov od vseh bolnikov z rakom, medtem ko so v ostalih dveh skupinah deleži približno 30 %. Večina preiskovancev pri vseh treh skupinah pa je imelo

daljše alele. Deleži posameznih genotipov za *IL-1RN* so bili v Hardy-Weinbergovem ravnovesju, saj so bile stopnje prostosti pod vrednostjo 3,84.

5.1.3 Statistična analiza zbranih genotipov alelov *IL-1B* in *IL-1RN*

Statistično analizo smo opravili z računalniškim programom »IBM SPSS Statistics 19«. Rezultate genotipizacije smo ovrednotili kot opisne spremenljivke in nato naredili navzkrižne tabele 2x2, da bi lahko preverili ali sta določeni spremenljivki odvisni oziroma neodvisni. Odvisnost spremenljivk smo določevali s statistično analizo χ^2 in njeno p-vrednostjo. S tem smo lahko primerjali posamezne skupine med seboj in določili skupino ljudi, ki imajo največje tveganje za razvoj raka želodca.

Delali smo s 95-odstotnim intervalom zaupanja, kjer je stopnja značilnosti α enaka 0,05. S tem lahko z gotovostjo trdimo, da so rezultati naših vzorcev v 95 % pravilni. Če smo dobili p-vrednost analize χ^2 manj kot 0,05, smo zavrnilo ničelno hipotezo, ki pravi da si spremenljivki nista v povezavi. S temi rezultati smo lahko zaključili, da sta si spremenljivki odvisni oziroma je v posameznih skupinah prisotna statistično značilna razlika v deležih. S tem potrdimo našo delovno hipotezo, da določen polimorfizem alelov *IL-1B* in *IL-1RN* poveča tveganje za razvoj raka oziroma razvoj gastritisa. V primeru, ko smo dobili p-vrednost analize χ^2 večjo kot stopnjo značilnosti 0,05, smo sprejeli ničelno hipotezo in dokazali, da ni medsebojne povezave med spremenljivkama. Rezultati analize so zbrani v preglednicah 9, 10 in 11.

Izračun statistične analize χ^2 in njene p-vrednosti je pokazala statistično neznačilne rezultate, saj je bila večina p-vrednosti večja od stopnje značilnosti $\alpha=0,05$. Statistično nismo našli povezave med proučevanimi polimorfizmi alelov *IL-1B* in *IL-1RN* in razvojem določene diagnoze, bodisi razvojem raka želodca ali kroničnega gastritisa, zato smo sprejeli ničelno hipotezo.

Z navzkrižnimi tabelami 2x2 smo skušali raziskati vpliv kombinacije dveh vnetnih citokinov pri različnih skupinah ljudi. Vendar smo zaradi nizkih deležev kratkih alelov za *IL-1RN* dobili statistično neznačilne rezultate. Dokazali smo, da prisotnost določenega genotipa v genu za vnetni citokin ni uporabna za identifikacijo ljudi s povečanim tveganjem za raka želodca. Presenetila nas je primerjava skupine bolnikov z rakom in skupine bolnikov z gastritisom, saj smo dobili mejne vrednosti p-vrednosti, in sicer 0,065 za genotip *IL-1B* -511*C/C (preglednica 9). Alel s C na mestu -511 gena za IL-1 β v literaturi še ni bil opisan kot dejavnik povečanega tveganja za razvoj raka. Za boljšo statistično moč študije bi bilo potrebno povečati število bolnikov v obeh skupinah in bi morda tako dobili značilne razlike v deležih genotipa C/C in dokazali povezavo med genotipom C in razvojem raka želodca. So pa rezultati naše študije pokazali, da okužba s *H. pylori* pri določenem vnetnem genotipu *IL-1B* -511*C/C povzroči povečan vnetni odgovor, atrofijo, ki nato vodi v vnetje sluznice želodca oziroma gastritis. Primerjali smo skupino bolnikov z gastritisom s skupino kontrol in izračunali p-vrednost, ki je 0,044 (preglednica 11). S tem rezultatom smo ovrgli ničelno hipotezo in sprejeli alternativno in tako našli statistično povezavo med tema dvema skupinama pri genotipu *IL-1B* -511*C/C.

Vemo, da so prisotne razlike v frekvencah pri polimorfizmu gena *IL-1B* pri različnih študijah posledica razlik populacijskih lastnosti. Za boljšo reprezentativnost rezultatov in statistično moč analize bi bilo potrebno v študijo vključiti večje število preiskovancev, predvsem bolnikov z rakom. Zato so potrebne še nadaljnje študije, ki bi preiskovale povezavo med rakom želodca in polimorfizmom v genu *IL-1B*.

5.2 SKLEPI

- V diplomski nalogi smo v slovenski populaciji ugotavljali ali genotipa *IL-1B* -511*T/T in *IL-1RN**2/2 vplivata na povečano tveganje za razvoj adenokarcinoma želodca pri bolnikih z okužbo s *H. pylori*. Iskani genotip *IL-1B* -511*T/T je izredno redek pri

vseh treh proučevanih skupinah: 8,0 % pri bolnikih z gastritisom, 10,3 % pri bolnikih z rakom in 13,0 % pri kontrolnih preiskovancih.

- Delež genotipa *IL-1B* -511*C/C je bil največji pri skupini bolnikov z gastritisom, 56 % vseh preiskovanih bolnikov z gastritisom, pri rakavih bolnikih je bil ta odstotek nižji in podoben kontrolam.
- Velik delež heterozigotov (46 % vseh preiskovanih) smo zasledili pri skupini bolnikov z gastritisom in kontrolni skupini.
- Kratki alel *IL-1RN**2 je presenetljivo najpogostejši v skupini kontrolnih oseb, in sicer 12,1 %. Pri skupini z gastritisom je delež iskanega alela 4,1 %, pri rakavih bolnikih pa 3,4 %. Statistično neznačilni rezultati niso v skladju z našo delovno hipotezo, po kateri naj bi polimorfizem *IL-1RN**2/2 vplival na razvoj raka želodca pri slovenski populaciji.
- V skupini rakov smo dokazali 41,4 % heterozigotov v genu *IL-1RN* od vseh bolnikov z rakom, medtem ko so v ostalih dveh skupinah deleži približno 30 %. Statistično nismo našli povezave med proučevanimi polimorfizmi in razvojem bolezni.
- Pokazali smo, da okužba s *H. pylori* pri genotipu *IL-1B**C/C povzroči povečano tveganje za razvoj gastritisa (p-vrednost je 0,044).
- Za natančnejšo analizo vpliva genetskih polimorfizmov in identifikacijo ljudi s povečanim tveganjem za razvoj bolezni, je potrebno razširiti študijo in vanjo vključiti večje število preiskovancev, predvsem bolnikov z gastritisom in rakavih bolnikov.

6 POVZETEK

H. pylori kolonizira človeški želodec in vzpostavi dolgo trajajočo okužbo sluznice želodca. Okužba sproži najprej kronični aktivni gastritis, ki se lahko razvije preko kroničnega atrofičnega gastritisa do intestinalne metaplazije in displazije ter kasneje do raka želodca. Kljub temu pa se ta process pojavi le pri deležu okuženih bolnikov, tako da je odvisen od bakterijskih kot tudi gostiteljevih genetskih dejavnikov (Machado in sod., 2002; Manxhuka-Kerliu in sod., 2009; Kusters in sod., 2006).

Od gostiteljevih genetskih dejavnikov so pomembni geni za citokine, ki vplivajo na patologijo gastritisa. Variante oziroma polimorfizmi v genih omogočajo raznoliko izločanje citokinov (Moorchung in sod., 2007). Okužba s *H. pylori* in s citokini spodbujen vnetni odziv igrata pomembno vlogo pri patogenezi raka želodca. Vnetje, ki ga povzroči okužba z bakterijo, sproži hipoklorhidrijo in atrofijo želodca, ki sta zgodnja prekurzorja razvoja raka želodca. Vendar le majhen delež okuženih razvije rak želodca. Genetske variacije v genih za citokine in njihovih receptorjih, ki določajo intenzivnost vnetnega odziva na okužbo, lahko prispevajo k različnim izidom okužbe in razvoju želodčnih lezij (Lu in sod., 2005).

Ob okužbi s *H. pylori* se izločanje IL-1 β v želodčni sluznici poveča. Za nastanek želodčnega raka je pomembno predvsem njegovo vnetno delovanje in močna inhibicija izločanja želodčne kisline (Sitarz in sod., 2008; El-Omar in sod., 2000). Antagonist receptorja za IL-1 (*IL-1RN*) je protivnetni citokin, ki tekmuje za receptor IL-1 in tako uravnana delovanje IL-1 β (Barbosa in sod., 2009). Polimorfizem *IL-1RN*2* je povezan z višjim izločanjem IL-1 β , najverjetneje preko zmanjšanja izločanja antagonista njegovega receptorja (El-Omar in sod., 2000). IL-1 β in njegov specifični naravni inhibitor, receptorski antagonist IL-1ra sta citokina, ki igrata ključno vlogo pri uravnavanju izločanja želodčne kisline in imunskega odziva v sluznici gastrointestinalnega trakta. El-Omar in sodelavci (2003) so identificirali vnetni profil

genetskih polimorfizmov pri genih za IL-1 β (prenašalci IL-1 β -511*T) in *IL-1RN* (*IL-1RN**2/2) za povečanje tveganja za razvoj raka želodca (Ito in sod., 2007).

S prvo tovrstno raziskavo na našem področju smo hoteli vsaj deloma osvetliti problem visoke incidence želodčnega raka v Sloveniji, ki bo lahko služil kot temelj za aktivnejše ukrepanje pri preprečevanju tako okužbe s *H. pylori*, kot tudi pri preprečevanju želodčnega raka.

V diplomski nalogi smo v slovenski populaciji ugotavljali ali genotipa *IL-1B* -511*T/T in *IL-1RN**2/2 vplivata na povečano tveganje za razvoj adenokarcinoma želodca pri bolnikih z okužbo s *H. pylori*. Hoteli smo identificirati tisto skupino ljudi, ki imajo povečano tveganje ter tako nadalje delovati na preventivnem področju razvoja bolezni, saj je njena incidenca pri nas v samem vrhu v Evropi.

Pri vseh preiskovancih smo ugotavljali prisotnost *H. pylori*, bodisi z identifikacijo bakterije s kulturo oziroma določitvijo specifičnih protiteles IgG proti *H. pylori*. Genotipe genov za IL-1 β smo določevali tako, da smo najprej izolirali človeško DNA in nato pomnožili odseke genomske DNA, v katerih se je nahajal predel gena s polimorfizmom. Za posamezen SNP se je na DNA vezala posamezna sonda. Tako smo lahko z merjenjem fluorescence določili posamezen genotip. Gen za *IL-1ra* ima več VNTR, ki se ločijo po velikosti. Alel 2 je najkrajši in ima 2 ponovitvi po 86 bp. Produkte pomnožene DNA smo ločili po velikosti z agarozno gelsko elektroforezo in določili kratek (S) ali dolg (L) alel gena *IL-1RN*.

Statistično značilnost rezultatov smo opravili z računalniškim programom »SPSS Statistics 19«. Pri vseh treh proučevanih skupinah smo dobili izredno majhen delež (8 do 13 % preiskovanih) iskanega genotipa *IL-1B* -511*T/T. Delež genotipa *IL-1B* -511*C/C je bil največji pri skupini z gastritisom, 56 %. Tu smo že po deležih posameznih genotipov dobili nakazano, da nosijo bolniki z gastritisom predvsem alel s C, medtem ko so rakavi bolniki po deležu podobni skupini kontrol.

Največji delež iskanega homozigotnega genotipa *IL-1B*2/2* smo presenetljivo dobili pri zdravi skupini kontrolnih oseb, in sicer 12,1 %. Pri skupini z gastritisom je delež iskanega alela 4,1 %, pri rakavih bolnikih pa 3,4 %. S tako nizkim deležem bi lahko že zavrnilo začetno delovno hipotezo za *IL-1ra*.

Pri proučevanju vpliva polimorfizmov v genih *IL-1B* in *IL-1RN* smo ugotovili, da genotipa *IL-1B -511*T/T* in *IL-1RN*2/2* statistično ne vplivata na povečano tveganje za razvoj raka želodca in zaključili, da prisotnost določenega genotipa ni uporabna za identifikacijo ljudi s povečanim tveganjem za rak želodca. Ugotovili pa smo, da okužba s *H. pylori* pri določenem vnetnem genotipu *IL-1B -511*C/C* povzroči povečan vnetni odgovor in nato gastritis. Taki bolniki potrebujejo eradikacijo bakterije, še preden se okužba razvije v kronični gastritis. Za nadaljnjo analizo bi bilo potrebno razširiti študijo in povečati število bolnikov v obeh skupinah, da bi dobili značilne razlike v deležih genotipa s *C/C* in bi lahko dokazali povezavo med genotipom s *C* in razvojem raka želodca.

7 VIRI

Algood H.M.S., Cover T.L. 2006. *Helicobacter pylori* persistence: An overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 4: 597–613.

Amersham Biosciences. 2003. MGB Eclipse Probe System: Real-time PCR and high performance SNP detection and allelic discrimination. Buckinghamshire, Amersham Biosciences: 4 str.

http://www.apczech.cz/pdf/DF_SNP_and_allelic.pdf (28. jun 2011)

Amieva M.R., El-Omar E. 2008. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 134, 1: 306–323.

Barbosa H.P.M., Martins L.C., Batista dos Santos S.E., Demachki S., Assumpção M.B., Aragão C.D., de Oliveira Corvelo T.C. 2009. Interleukin-1 and TNF- α polymorphisms and *Helicobacter pylori* in a Brazilian Amazon population. *World Journal of Gastroenterology*, 15, 12: 1465–1471.

Berensmeier S. 2006. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 3: 495–504.

Bowers D. 2007. Testing hypotheses about the equality of population proportions: the chi-squared test. V: *Medical statistics from scratch*. 2nd ed. Bowers D. (ed.). Chichester, JohnWiley & Sons Ltd: 161–168.

Buyyarapu R., Kumpatla S., Elango N., Chen W., Greene T.W. 2010. KASPar: An efficient and cost-effective technology for SNP genotyping in cotton. V: 2010 Beltwide Cotton Conferences, New Orleans, Louisiana, January 4–7 2010. Cordova, Tennessee, National Cotton Council: 772–774.

Camargo M.C., Mera R., Correa P., Peek R.M., Fontham E.T.H., Goodman K.J., Piazuelo M.B., Sicinski L., Zabaleta J., Schneider B.G. 2006. Interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and gastric cancer: A meta-analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15, 9: 1674–1687.

Cauci S., Santolo M.D., Ryckman K.K., Williams S.M., Banfi G. 2010. Variable number of tandem repeat polymorphism of the interleukin-1 receptor antagonist gene *IL-1RN*: a novel association with the athlete status. *BMC Medical Genetics*, 11: 29–40.

Chandanos E., Lagergren J. 2008. Oestrogen and the enigmatic male predominance of gastric cancer. *European Journal of Cancer*, 44, 16: 2397–2403.

Dixon M.F., Genta R., Yardley J.H., Correa P. 1996. Classification and grading of gastritis: The updated Sydney system. *American Journal of Surgical Pathology*, 20, 10: 1161–1181.

Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K., Mattick J.S. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, 19, 14: 4008.

Egan B.J., Katicic M., O'Connor H.J., O'Morain C.A. 2007. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 12, 1: 31–37.

El-Omar E.M., Carrington M., Chow W.H., McColl K.E.L., Breamk J.H., Young H.A., Herrera J., Lissowska J., Yuan C.C., Rothman N., Lanyon G., Martin M., Fraumeni Jr. J.F., Rabkin C.S. 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, 404, 6776: 398–402.

El-Omar E.M., Rabkin C.S., Marilie D.G., Vaughan T.L., Harvey A.R., Schoenberg J.B., Stanford J.L., Mayne S.T., Goedert J., Blot W.J., Fraumeni J.F., Chow W.H. 2003. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*, 124, 5: 1193–1201.

Figueiredo C., Machado J.C., Pharoah P., Seruca R., Sousa S., Carvalho R., Capelinha A.F., Quint W., Caldas C., van Doorn L.J., Carneiro F., Sobrinho-Simoes M. 2002. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: An opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 94, 22: 1680–1687.

Gandos A., Bray F., Brewster D.H., Coebergh J.W.W., Hakulinen T., Janssen-Heijnen M.L.G., Kurtinaitis J., Brenner H. The EUNICE Survival Working Group. 2008. Recent trends in cancer survival across Europe between 2000 and 2004: A model-based period analysis from 12 cancer registries. *European Journal of Cancer*, 44, 10: 1463–1475.

Garcia-Gonzales M.A., Lanás A., Santolaria S., Crusius J.B., Serrano M.T., Pena A.S. 2001. The polymorphic *IL-1B* and *IL-1RN* genes in the aetiopathogenesis of peptic ulcer. *Clinical and Experimental Immunology*, 125, 3: 368–375.

Garcia-Gonzales M. A., Savelkoul P.H.M., Benito R., Santolaria S., Crusius J.B.A., Pena A.S., Lanás A. 2005. No allelic variant associations of the *IL-1* and *TNF* gene polymorphisms in the susceptibility to duodenal ulcer disease. *International Journal of Immunogenetics*, 32, 5: 299–306.

Glas J., Török H.P., Schneider A., Brännler G., Kopp R., Albert E.D., Stolte M., Folwaczny C. 2004. Allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with early gastric cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22, 23: 4746–4752.

Gold B.D., van Doorn L-J., Guarner J., Owens M., Pierce-Smith D., Song Q., Hutwagner L., Sherman P.M., de Mola O.L., Czinn S.J. 2001. Genotypic, clinical, and demographic characteristics of children infected with *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 4: 1348–1352.

Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A. 1999. Proteins can be detected and quantitated by using an enzyme-linked immunosorbent assay. V: Kuby immunology. 4th ed. Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A., Kuby J. (ed.). New York, W. H. Freeman and Company: 162-162.

Gordis L. 2004. Case-control and cross-sectional studies. V: Epidemiology. 3rd ed. Gordis L. (ed.). Philadelphia, Elsevier Saunders: 159–176.

Gromadzka G., Członkowska A. 2010. Influence of IL-1RN intron 2 variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism on the age of onset of neuropsychiatric symptoms in Wilson's disease. *International Journal of Neuroscience*, 121, 1: 9–15.

Hecker K.H., Roux K.H. 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques*, 20, 3: 478–485.

Helicobacter and Cancer Collaborative Group. 2001. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut*, 49, 3: 347–353.

Hight A.R., Gibson C.S., Goldwater P.N. 2010. Variant interleukin 1 receptor antagonist gene alleles in sudden infant death syndrome. *Archives of Disease in Childhood*, 95, 12: 1009–1012.

Hu S., Song Q.B., Yao P.F., Hu Q.L., Hu P.J., Zeng Z.R., Pang R.P. 2005. No relationship between IL-1B gene polymorphism and gastric acid secretion in younger healthy volunteers. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 41: 6549–6553.

Ishihara S., Rumi M.A.K., Kadowaki Y., Ortega-Cava C.F., Yuki T., Yoshino N., Mivvoka Y., Kazumori H., Ishimura N., Amano Y., Kinoshita Y. 2004. Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Journal of Immunology*, 173, 2: 1406–1416.

Ito H., Kaneko K., Makino R., Konishi K., Kurahashi T., Yamamoto T., Katagiri A., Kumekawa Y., Kubota Y., Muramoto T., Mitamura K., Imawari M. 2007. Interleukin-1beta gene in esophageal, gastric and colorectal carcinomas. *Oncology Reports*, 18, 2: 473–481.

Jorge Y.C., Duarte M.C., Silva A.E. 2010. Gastric cancer is associated with *NOS2* -954G/C polymorphism and environmental factors in a Brazilian population. *BMC Gastroenterology*, 10: 64–84.

Kamangar F., Abnet C.C., Hutchinson A.A., Newschaffer C.J., Helzlsouer K., Shugart Y.Y., Pietinen P., Dawsey S.M., Albanes D., Virtamo J., Taylor P.R. 2006. Polymorphisms in inflammation-related genes and risk of gastric cancer (Finland). *Cancer Causes and Control*, 17, 1: 117–125.

Kamangar F., Cheng C., Abnet C.C., Rabkin C.S. 2006. Interleukin-1B polymorphisms and gastric cancer risk: A meta-analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention*, 15, 10: 1920–1928.

KBioscience. 2011a. The KASP SNP Genotyping Manual v 3.0. Hoddesdon, KBioscience: 15 str.

<http://www.kbioscience.co.uk/download/KASP%20manual%20v3.pdf> (28. Jun 2011)

KBioscience. 2011b. KASPar SNPGenotyping System: Reagent Manual. Hoddesdon, KBioscience: 15 str.

http://dna.uga.edu/docs/KASPar_SNP_Genotyping_Manual%20%28KBioscience%29.pdf

(28. jun 2011)

Kirchgesser M., Schlagenhauer R., Kirchner B., Adem C., Malmberg W., Tgetgel A., Huber I., Nieswandt V., Walter T. 2003. The New MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kits – fast and flexible fully automated sample preparation. *Biochemica*, 4: 12–14.

Kirchgesser M., Adem C., Baumgartner A., Girghuber H., Malmberg W., Schmitt I., Nieswandt V., Eberle W. 2006. Automated isolation of DNA from tissue samples in 35–50 minutes: Fast and easy purification combining the MagNA Lyser and the MagNA Pure Compact System. *Biochemica*, 1: 9–10.

Kodama M., Murakami K., Sato R., Okimoto T., Nishizono A., Fujioka T. 2005. *Helicobacter pylori*-infected animal models are extremely suitable for the investigation of gastric carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 45: 7063–7071.

Korbie D.J., Mattick J.S. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3, 9: 1452–1456.

Kusters J.G., van Vliet A.H.M., Kuipers E.J. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 3: 449–490.

Lee J.H., Park Y., Choi J.R., Lee E.K., Kim H.S. 2010. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. *Yonsei Medical Journal* 51, 1: 104–110.

Lewallen S., Courtright P. 1998. Epidemiology in practice: Case-control studies. *Epidemiology, Community Eye Health*, 11, 28: 57–58.

Lu W., Pan H., Zhang L., Lin D., Miao X., You W. 2005. Genetic polymorphisms of interleukin IL-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor α and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis*, 26, 3: 631–636.

Machado J.C., Pharoah P., Sousa S., Carvalho R., Oliveira C., Figueiredo C., Amorim A., Seruca R., Caldas C., Carneiro F., Sobrinho-Simoes M. 2001. Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 121, 4: 823–829.

Machado J.C., Pharoah P., Seruca R., Sousa S., Carvalho R., Capelinha A.F., Quint W., Caldas C., van Doorn L.J., Carneiro F., Sobrinho-Simoes M. 2002. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: An opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 94, 22: 1680–1687.

Machado J.C., Figueiredo C., Canedo P., Pharoah P., Carvalho R., Nabais S., Alves C.C., Campos M.L., van Doorn L.J., Caldas C., Seruca R., Carneiro F., Sobrinho-Simoes M. 2003.

A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 125, 2: 364–371.

Manxhuka-Kerliu S., Telaku S., Devolli-Disha E., Ahmetaj H., Sahatciu-Meka V., Kerliu A., Loxha S., Shahini L., Gashi G., Podrimaj A. 2009. *Helicobacter pylori* gastritis updated Sydney classification applied in our material. Section of Biological and Medical Sciences, 30, 1: 45–60.

Marshall B.J., Warren J.R. 2005. The bacterium *Helicobacter pylori* and its role in gastritis and peptic ulcer disease - Press Release: The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine. Stockholm, The Nobel Committee for Physiology or Medicine: 1 str.

http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html (28. jun 2011)

Mart Microbiology B. V. 2006. Anoxomat Mark II system. Drachten, Mart Microbiology B. V: 1str.

<http://www.anoxomat.com/english/standardpage.php?ArtikelID=39> (28. jun 2011)

Meirik O. 2008. Cohort and case-control studies. V: Reproductive health. From research to practice: Training in reproductive health research, February 4–March 8 2008, Geneva, Switzerland. Geneva, Geneva Foundation for Medical Education and Research, Faculty of Medicine: 1–5.

http://www.gfmer.ch/Books/Reproductive_health/Cohort_and_case_control_studies.html (28. jun 2011)

Moorchung N., Srivastava A.N., Gupta N.K., Ghoshal U.C., Achyut B.R., Mittal B. 2007. Cytokine gene polymorphisms and the pathology of chronic gastritis. *Singapore Medical Journal*, 48, 5: 447–454.

Murphy G., Thornton J., McManus R., Swan N., Ryan B., O'Morain C.A., Hughes D.J., O'Sullivan M. 2009. Association of gastric disease with polymorphisms in the inflammatory related genes *IL-1B*, *IL-1RN*, *IL-10*, *TNF* and *TLR4*. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21, 6: 630–635.

Olson J.W., Maier R.J. 2002. Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. *Science*, 298, 5599: 1788–1790.

Powledge T.M. 2004. The polymerase chain reaction. *Advances in Physiology Education*, 28: 44–50.

Qiagen GmbH. 2001. QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook. Hilden, Qiagen GmbH: 68 str.

http://www.calpoly.edu/~bio/ubl/protocols_files/qiaalu.pdf (28. jun 2011)

Qiagen GmbH. 2011. TissueLyser II. Hilden, Qiagen GmbH: 1 str.

<http://www.qiagen.com/products/tissuelyserii.aspx> (28. jun 2011)

Queiroz D.M., Guerra J.B., Rocha G.A., Camargos Rocha A.M., Santos A., De Oliveira A.G., Demas Alvares Cabral M.M., Ferreira Nogueira A.M.M., De Oliveira C.A. 2004. *IL1B* and *IL1RN* polymorphic genes and *Helicobacter pylori cagA* strains decrease the risk of reflux esophagitis. *Gastroenterology*, 127, 1: 73–79.

Rocha G.A., Becattini Guerra J., Camargos Rocha A.M., Borges Saraiva I.E., Alves da Silva D., Affonso de Oliveira C., Magalhães Queiroz D.M. 2005. IL1RN polymorphic gene and *cagA*-positive status independently increase the risk of noncardia gastric carcinoma. *International Journal of Cancer*, 115, 5: 678–683.

Roche Applied Science. 2003. The new MagNA Pure Compact System: The smart solution for quick and fully automated low-throughput nucleic acid purification. Mannheim, Roche Diagnostics GmbH. Biochemica, 4: 11–12.

https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/BIOCHEMI/no4_03/PDF/p11_12.pdf

(28. jun 2011)

Roche Applied Science. 2009a. Magnetic-bead technology. Mannheim, Roche Diagnostics GmbH: 1 str.

https://www.roche-applied-science.com/ProdInfo/en_US/3_8_2_1_1_1.htm (28. jun 2011)

Roche Applied Science. 2009b. LightCycler 480II, Mannheim, Roche Diagnostics GmbH: 1 str.

[http://www.roche.es/portal/eipf/Spain/spain_portal/roche-spain/productos?siteUuid=re7127001&paf_gear_id=33000033&pageId=re7364116&synergycation=show&paf_dm=full&nodeId=1415-](http://www.roche.es/portal/eipf/Spain/spain_portal/roche-spain/productos?siteUuid=re7127001&paf_gear_id=33000033&pageId=re7364116&synergycation=show&paf_dm=full&nodeId=1415-1dfa3ba010a911df9bc7351a3623dd67&categoryId=re7127001_ct23021)

[1dfa3ba010a911df9bc7351a3623dd67&categoryId=re7127001_ct23021](http://www.roche.es/portal/eipf/Spain/spain_portal/roche-spain/productos?siteUuid=re7127001&paf_gear_id=33000033&pageId=re7364116&synergycation=show&paf_dm=full&nodeId=1415-1dfa3ba010a911df9bc7351a3623dd67&categoryId=re7127001_ct23021) (28. jun 2011)

Roux K.H. 2009. Optimization and troubleshooting in PCR. Cold Spring Harbor Protocol, 2009, 4: 66–67.

Safe Drinking Water Foundation. 2009. *Helicobacter pylori*. Saskatoon, Safe Drinking Water Foundation: 6 str.

http://www.safewater.org/PDFS/resourcesknowthefacts/Heliobacter_Pylori.pdf (28. jun 2011)

Schembri M.A., Lin S.K., Lambert J.R. 1993. Comparison of commercial diagnostic tests for *Helicobacter pylori* antibodies. Journal of Clinical Microbiology, 31, 10: 2621–2624.

Sitarz R., de Leng W.W.J., Polak M., Morsink F.H.M., Bakker O., Polkowski W.P., Maciejewski R., Offerhaus G.J.A., Milne A.N. 2008. IL-1B –31T>C promoter polymorphism is associated with gastric stump cancer but not with early onset or conventional gastric cancers. *Virchows Archiv*, 453, 3: 249–255.

Smith K. 2002. Genetic polymorphism and SNPs: Genotyping, haplotype assembly problem, haplotype map, functional genomics and proteomics. New York, Mendeley Inc: 13 str.

http://www.cs.mcgill.ca/~kaleigh/compbio/snp/snp_summary.html (27. jun 2011)

Stolte M., Meining A. 2001. The updated Sydney system: Classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 15, 9: 591–598.

Struhers J.K., Westran R.P. 2003. Infections of the alimentary canal. V: *Clinical bacteriology* 1st ed. Northcott J. (ed.). London, Manson Publishing Ltd: 80–91.

Su B., Ceponis P.J.M., Lebel S., Hujnh H., Sherman P.M. 2003. *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 71, 6: 3296–3502.

Szeto M.L., Lee C.K., Yee Y.K., Li K.F., Lee W.K., Lee C.C., Que T.L., Wong B.C.Y. 2001. Evaluation of five commercial serological tests for the detection of *Helicobacter pylori* infection in Chinese. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 15, 5: 703–706.

Tepš B., Kavalar R. 2010. Adenokarcinom želodca, možnosti preprečevanja in predlogi za endoskopsko in histološko spremljanje predrakavih sprememb v želodcu. *Zdravniški Vestnik*, 79: 366–374.

Waltenberger H., Ziesemer M., Deucker A. 2004. MagNA Pure Compact System – Results of a performance study for viral nucleic acid isolation from serum and plasma samples. *Biochemica*, 3: 10–11.

Wu W.M., Tsai H.J., Pang J.H.S., Wang H.S., Hong H.S., Lee Y.S. 2005. Touchdown thermocycling program enables a robust single nucleotide polymorphism typing method based on allele-specific real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 339, 2: 290–296.

Xue H., Lin B., Ni P., Xu H., Huang G. 2010. Interleukin-1B and interleukin-1 RN polymorphism and gastric carcinoma risk: A meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25, 10: 1604–1617.

Zamboni C.F., Basso D., Navaglia F., Belluco C., Falda A., Fogar P., Greco E., Gallo N., Ruge M., Di Mario F., Plebani M. 2005. Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome. *Cytokine*, 29, 4: 141–152.

ZAHVALA

Najpej se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Alojz Ihanu, dr. med., ki me je vzel pod svoje mentorstvo in mi omogočil pridobiti nova znanja in izkušnje. Hvala za ves čas, ki mi ga je namenil za nastanek diplomskega dela.

Še posebno se zahvaljujem asist. Samu Jeverici, dr. med., za vodenje, vse strokovne nasvete in usmerjanje pri laboratorijskem delu ter za zaupanje in pomoč pri izvedbi diplomske naloge. Rad bi se zahvalil tudi njegovim sodelavkam Olgi, Danijeli, Petri, Tini in Urši iz Laboratorija za diagnostiko aerobnih in anaerobnih bakterijskih infekcij, za prijetno vzdušje v laboratoriju, da so me lepo sprejele v svoj kolektiv in mi z veseljem in smehom polepšale vsakdan.

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Blagajani Herzog Velikonji za recenzijo diplomskega dela.

Za pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu se prav tako zahvaljujem Romini iz Laboratorija za molekularno bakteriologijo, Nini in Moniki iz Laboratorija za diagnostiko virusnih infekcij in kolegici Sari Mankoč.

Hvala tudi vsem prijateljem, sošolcem in kolegom, ki so polepšali moje študentske dni. Posebna zahvala gre prezgodaj preminulemu kolegu in prijatelju Nejcu Pauliču, kateremu poklanjam to diplomsko delo, ki je prav tako verjel vame in mi svetoval na vseh področjih. Hvala ti Nejc.

Nenazadnje bi se rad iz srca zahvalil moji družini brez katerih verjetno ne bi uspel. Zahvaljujem se jim za spodbudo in podporo tekom študija in pri nastajanju diplome ter ker mi vedno stojijo ob strani.

Najlepša hvala vsem!