

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA HARC

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA HARC

**DOLOČITEV AVTOPROTITELES PROTI PROTEINOM AKUTNE FAZE Z  
ENCIMSKO IMUNSKIMI METODAMI**

**DETECTION OF AUTOANTIBODIES AGAINST ACUTE PHASE PROTEINS  
WITH ENZYME IMMUNOASSAYS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma na Kliničnem oddelku za revmatologijo v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana, pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik in somentorstvom doc. dr. Katje Lakota.

### **Zahvala**

Najlepše se zahvaljujem mentorici, doc. dr. Saši Čučnik, in somentorici, doc. dr. Katji Lakoti, za strokovno usmerjanje pri nastajanju naloge. Prav tako se zahvaljujem Tadeji Kuret, mag. lab. biomed., za uvajanje v laboratorijsko delo, napotke, usmeritve in popravke. Iskrena hvala tudi moji družini in prijateljem za podporo skozi vsa leta študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno, pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik in somentorstvom doc. dr. Katje Lakota. Naloga je del raziskovalnega programa Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije, z naslovom Sistemske avtoimunske bolezni, pod vodstvom izr. prof. dr. Snežne Sodin Šemrl.

Ljubljana, 2018

# VSEBINA

VSEBINA.....	II
POVZETEK.....	IV
ABSTRACT.....	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VI
1 UVOD.....	1
1. 1 Vnetje.....	1
1. 2 Reakcija akutne faze.....	2
1. 3 Proteini akutne faze.....	3
1. 3. 1 Glavni proteini akutne faze.....	3
1. 3. 2 Zmerno povišani proteini akutne faze.....	7
1. 3. 3 Rahlo povišani proteini akutne faze.....	8
1. 3. 4 Znižani proteini akutne faze.....	9
1. 4 Kronično vnetje in avtoimunske bolezni.....	9
1. 5 Avtoprotitelesa proti proteinom akutne faze.....	10
1. 6 Naravna protitelesa.....	11
1. 7 Encimsko-immunske metode za določitev serumskih protiteles.....	12
2 NAMEN DELA.....	14
3 MATERIALI IN METODE.....	16
3. 1 Humani serumi.....	16
3. 2 Antigeni.....	16
3. 3 Konjugati.....	17
3. 4 Kemikalije.....	17
3. 5 Pufri.....	18
3. 5. 1 Pufri za metodo točkovnega prenosa.....	18
3. 5. 2 Pufri za encimsko-immunsko metodo na trdnem nosilcu.....	19
3. 5. 3 Pufri za poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata.....	20
3. 6 Aparature in pribor.....	21

3. 7 Metoda točkovnega prenosa .....	21
3. 8 Encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu .....	23
3. 9 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata in prenos po Westernu .....	25
4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	28
4. 1 Metoda točkovnega prenosa .....	28
4. 1. 1 Spreminjanje pogojev analize oziroma protokola .....	29
4.1.1.1 Sprememba pufra za blokado .....	29
4.1.1.2 Sprememba koncentracije antigena .....	30
4.1.1.3 Sprememba (koncentracije) sekundarnega protitelesa .....	32
4. 1. 2 Semikvantitativno ovrednotenje rezultatov .....	33
4.1.2.1 Protitelesa proti serumskemu amiloidu A .....	33
4.1.2.2 Protitelesa proti serumskemu amiloidu A1 .....	35
4.1.2.3 Protitelesa proti C-reaktivnemu proteinu .....	36
4.1.2.4 Protitelesa proti alfa 1-kislemu glikoproteinu .....	37
4.1.2.5 Protitelesa proti vitronektinu .....	39
4. 2 Encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu .....	41
4. 2. 1 Protitelesa proti serumskemu amiloidu A .....	41
4. 2. 2 Protitelesa proti serumskemu amiloidu A1 .....	42
4. 2. 3 Protitelesa proti serumskemu amiloidu A, vezanem na lipoprotein visoke gostote.....	44
4. 3 Prenos po Westernu .....	47
4. 3. 1 Protitelesa proti albuminu.....	47
4. 3. 2 Protitelesa proti alfa 1-antitripsinu .....	48
4. 3. 3 Protitelesa proti C-reaktivnemu proteinu .....	51
5 SKLEP .....	53
6 LITERATURA .....	56

## POVZETEK

Vnetje z reakcijo akutne faze je zaščitni mehanizem prirojenega imunskega odziva, ki vključuje tkivne celice, lokalno žilje in imunski sistem. Med njim pride do sprememb koncentracij plazemskih proteinov, imenovanih proteini akutne faze, katerih koncentracija se zviša ali zniža za vsaj 25 %. Po končanem vnetju se njihove koncentracije povrnejo nazaj na bazalne vrednosti, mehanizmi pa še niso pojasnjeni. Sklepajo, da bi pri tem lahko imela vlogo avtoprotitelesa, usmerjena proti proteinom akutne faze, ki so v preteklosti že bila zaznana tako pri bolnih kot pri zdravih posameznikih. V naši nalogi smo s pomočjo encimsko-immunskih metod kvalitativno in kvantitativno določali prisotnost avtoprotiteles proti nekaterim proteinom akutne faze v serumih zdravih krvodajalcev in bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi ter srčno-žilnimi boleznimi. S pomočjo metode točkovnega prenosa smo določili prisotnost avtoprotiteles proti serumskemu amiloidu A, serumskemu amiloidu A1, C-reaktivnemu proteinu, vitronektinu in alfa 1-kislemu glikoproteinu pri zdravih krvodajalcih, kar kaže na naravno prisotnost teh protiteles. Reakcijo smo semikvantitativno ovrednotili z denzitometrijo in povprečni nivoji omenjenih avtoprotiteles so bili pri vseh skupinah bolnikov znotraj medkvartilnega razpona zdravih krvodajalcev. Z uporabo encimsko-immunske metode na trdnem nosilcu smo kvantitativno določili nivoje avtoprotiteles proti serumskemu amiloidu A, serumskemu amiloidu A1 in serumskemu amiloidu A, vezanemu na molekulo lipoproteina visoke gostote. Opazili smo, da so vrednosti avtoprotiteles proti nevezanemu serumskemu amiloidu A v splošnem višje od nivojev avtoprotiteles proti ostalima dvema različicama. Z imunodetekcijo po elektroforeznem ločevanju proteinov in prenosu po Westernu smo ugotovili, da avtoprotitelesa proti albuminu niso prisotna ne pri zdravih krvodajalcih in ne pri skupinah bolnikov. Avtoprotitelesa proti alfa 1-antitripsinu so bila prisotna pri vseh bolnikih s sistemsko sklerozo ( $n = 7$ ) in gigantoceličnim arteritisom ( $n = 8$ ), odsotna pa pri vseh bolnikih z zgodnjim revmatoidnim artritisom ( $n = 4$ ). Pri prenosu C-reaktivnega proteina na membrano pa smo zaznali, da pride do vezave avtoprotiteles na multimerne oblike pri vseh skupinah preiskovancev, vezava na monomerno obliko pa je najbolj intenzivna pri skupini bolnikov z zgodnjim revmatoidnim artritisom. Ugotovili smo, da so avtoprotitelesa proti večini izbranih proteinov akutne faze (razen proti albuminu in alfa 1-antitripsinu) v večini primerov prisotna tako pri zdravih kot tudi pri vseh skupinah bolnikov. V prihodnosti bi torej bilo potrebno razviti metode, ki bi bolj natančno določile nivoje posameznih avtoprotiteles.

## **ABSTRACT**

Inflammation with acute phase response is a protective mechanism of innate immune response, which includes tissue cells, local blood vessels and immune system. During inflammation, concentrations of some plasma proteins, known as acute phase proteins, change and get lower or higher for at least 25 %. After resolution of inflammation their concentrations come back to normal, but mechanisms are not yet clarified. It is assumed, that autoantibodies against acute phase proteins, which were already detected in sera of patients and healthy blood donors in the past, could have a role in the resolution. In this thesis we qualitatively and quantitatively determined the presence of autoantibodies against some acute phase proteins with enzyme immunoassay methods in sera of healthy blood donors and patients with systemic autoimmune and circulatory diseases. We determined the presence of autoantibodies against serum amyloid A, serum amyloid A1, C-reactive protein, vitronectin and alpha-1-acid glycoprotein in sera of healthy blood donors with dot blotting, which shows a natural presence of these autoantibodies. We qualitatively evaluated the results with densitometry and all groups of patients had average levels of autoantibodies within the interquartile range of healthy blood donors' values. With enzyme-linked immunosorbent assay we quantitatively determined the levels of autoantibodies against serum amyloid A, serum amyloid A1 and serum amyloid A linked with molecule of high-density lipoprotein. We noticed that the levels of autoantibodies against serum amyloid A were in general higher than the autoantibodies against the other two variants. With immunodetection after the electrophoresis and Western blotting we noticed that autoantibodies against albumin are not present in sera of healthy blood donors nor in sera of patients. Autoantibodies against alpha-1-antitrypsin were present in sera of all patients with systemic sclerosis (n = 7) and giant cell arteritis (n = 4), but were not present in sera of any patient with early rheumatoid arthritis (n = 4). With Western blotting of C-reactive protein we found out that autoantibodies bound on multimeric protein forms at all subject groups, but not on monomeric form – the most intense results were with sera of patients with early rheumatoid arthritis. We have determined that autoantibodies against most of the tested acute phase proteins (except against albumin and alpha-1-antitrypsin) were present in majority of sera of healthy blood donors and patients. In the future it will be necessary to develop new methods, which will be able to determine levels of autoantibodies more accurately.

## SEZNAM OKRAJŠAV

A	absorbanca
A1AT	alfa 1-antitripsin
A1AG1	alfa 1-kisli glikoprotein
AAV	vaskulitis, povezan s protitelesi proti citoplazmi nevtrofilcev
anti-APP	avtoprotitelesa proti proteinom akutne faze
APP	proteini akutne faze (angl. <i>Acute-phase Proteins</i> )
APR	reakcija akutne faze (angl. <i>Acute-phase Response</i> )
APS	antifosfolipidni sindrom
AT	arterijska tromboza
AE	arbitrarne enote
BSA	goveji serumski albumin (angl. <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CRP	C-reaktivni protein
CV	koeficient variabilnosti
DB	metoda točkovnega prenosa (angl. <i>Dott Blott</i> )
DEA	dietanolaminski pufer
ELISA	encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu (angl. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
eRA	zgodnji revmatoidni artritis
GCA	gigantocelični arteritis
HDL	lipoprotein visoke gostote
Ig	imunoglobulin (tipa A = IgA, tipa G = IgG, tipa M = IgM)
IL-1	interlevkin-1
IL-6	interlevkin-6
IL-8	interlevkin-8
IQR	medkvartilni razpon (angl. <i>Interquartile Range</i> )
Kf	korekcijski faktor
mCRP	monomerni/modificiran C-reaktivni protein
PAI-1	inhibitor aktivatorja plazminogena
PBS	s fosfatom pufrana fiziološka raztopina (angl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
RA	revmatoidni artritis



RV	izvorni obseg (angl. <i>Raw Volume</i> )
SAA	serumski amiloid A
SAA1	serumski amiloid A1
SAA2	serumski amiloid A2
SAA-HDL	serumski amiloid A, vezan na lipoprotein visoke gostote
SDS	natrijev dodecilsulfat
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
SjS	Sjögrenov sindrom
SLE	sistemski lupus eritematozus
SP	srčno popuščanje
SSc	sistemska skleroza
TBS	s Trisom pufrana fiziološka raztopina (angl. <i>Tris-buffered Saline</i> )
TNF- $\alpha$	dejavnik tumorske nekroze alfa
VTNC	vitronektin
VT	venska tromboza

# 1 UVOD

## 1.1 Vnetje

Vnetje ali vnetna reakcija je odziv tkiva na okvaro in je eden izmed mehanizmov prirojene imunske obrambe, ki ga lahko izzovejo različni dejavniki okolice (biološki, kemični, fizikalni) ali pa specifični antigeni bakterij, gliv in virusov. Njegov namen je zaščitni, saj skuša preprečiti vdor, omejiti in odstraniti škodljive zunanje antigene ter tudi delce lastnih poškodovanih celic. Lokalna tkivna reakcija temelji na stalno prisotnih celicah obrambe, ki krožijo po telesu in nespecifično napadejo tuje molekule. Ravno zaradi stalne pripravljenosti reakcija poteče zelo hitro in v večini primerov tudi dovolj učinkovito, da se »napad« ustavi že na lokalni ravni, v nasprotnem primeru pa se nadaljuje še na sistemski ravni. Glavni spremembi, ki sta vidni v vnetišču, sta rdečica in oteklina, področje pa je tudi toplo, boleče. Ti znaki so posledica sprememb v kapilarah, ki so med vnetjem razširjene in bolj prepustne kot običajno – tako omogočajo večji dotok krvi na prizadeto področje in migracijo večjih obrambnih molekul v okoliško tkivo (1–3).

Lokalno vnetno reakcijo lahko razdelimo na dva dela – v prvem delu pride do prepoznave tujka, v drugem pa do aktivacije in mobilizacije efektorskih celic, ki tujek odstranijo. Tipe obrambnih celic, ki sodelujejo pri obeh delih, povezujejo vnetni citokini, ki omogočajo medsebojno komunikacijo in usklajevanje procesa. Za prepoznavo tujka so odgovorni predvsem topni plazemski proteini in receptorji na površini celic, ki prepoznavajo značilne molekulske vzorce patogenov. Ti vzorci so evolucijsko ohranjeni in so del konstitutivno izraženih struktur, ki so nujno potrebne za preživetje patogena. Naš organizem takih proteinskih molekul ne izdeluje, kar imunskim celicam omogoča ločevanje med lastnimi zdravimi celicami, lastnimi napadenimi celicami in celicami napadalca. Naš organizem pa sintetizira z nevarnostjo povezane molekulske vzorce, ki so odgovorni za neinfektivni vnetni proces. Ob prepoznavi in vezavi značilnega molekulskega vzorca začne receptor delovati kemotaktično in tako omogoči obrambnim celicam, da potujejo do področja vnetja, spodbudi pa tudi izločanje ostalih mediatorjev vnetja (4, 5). Drugi del lokalne vnetne reakcije se začne z aktivacijo komplementa preko encimske kaskade – aktivirane komponente komplementa se vežejo na površino bakterij ali virusov ter s tem kemotaktično privabijo fagocite in spodbudijo fagocitozo vezanega patogena. Pride tudi do degranulacije mastocitov in bazofilcev, ki sprostijo histamin. Ta deluje na žilje in poveča predvsem prepustnost žilnega endotelija. Poškodba tkiva aktivira še encimsko kaskado,

imenovano kininski sistem. V tem sistemu nastaja bradikinin, ki – podobno kot histamin – deluje na žilje, vendar povzroči njihovo razširitev. Ob morebitni poškodbi žilne stene se aktivira koagulacijski sistem – kaskada reakcij, ki vodijo v nastanek krvnega strdka, ta pa prepreči vdor patogenov v krvni obtok in izgubo krvi (4). Kadar pa lokalna reakcija tkiva ni zadostna, preide vnetje s pomočjo delovanja citokinov na sistemsko raven (5).

## **1. 2 Reakcija akutne faze**

Reakcija akutne faze (APR) je del prirojenega imunskega sistema, ki je nadzorovana predvsem s citokini, in deluje na sistemski ravni organizma. Citokini so topni, kratko živeči proteini, ki jih izločajo predvsem imunske celice na vnetnih mestih, čeprav imajo lahko več virov, prav tako pa tudi več tarč in funkcij. Med pomembnejše vnetne citokine spadajo predvsem dejavnik tumorske nekroze alfa ( $TNF-\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) in interleukin-8 (IL-8).  $TNF-\alpha$  in IL-1 vplivata na lokalne spremembe žilja, pri čemer povzročita dilatacijo kapilar in spremembo adhezivnih lastnosti žilnega endotelija, kar omogoča nevtrofilnim granulocitom in ostalim levkocitom oprijem stene in migracijo v okolico poškodovanega tkiva. Nevtrofilni granulociti so glavne efektorske celice, ki so sposobne fagocitoze tudi v anaerobnih pogojih, so pa relativno kratko živeče in njihovo odmiranje povzroči tvorbo gnoja v vnetišču. Citokini na mesto vnetja privabijo tudi monocite, ki nato v tkivu dozoriijo v makrofage, in naravne celice ubijalke. Te z apoptozo uničijo lastne celice, okužene s patogeni – pri virusni okužbi jim pomaga specifičen citokin interferon 1, ki prepozna in označi lastne okužene celice ter tako prepreči širitev virusa. Sistemsko delovanje citokinov se na nivoju celotnega organizma kaže z različnimi vedenjskimi, biokemijskimi, jetrnimi in metabolnimi spremembami. Med temi je pomembna predvsem povišana telesna temperatura, ki poveča učinkovitost celic imunskega sistema in hkrati deluje neugodno na razmnoževanje patogena. Ostali sistemski učinki so med drugimi še šibkost, zaspanost in neješčnost, ki so taktičen način varčevanja z energijo. Spremeni se tudi sestava plazme, saj nekateri citokini v jetrnih celicah povečajo (ali zmanjšajo) proizvodnjo in izločanje okrog 30 plazemskih proteinov, ki jih imenujemo proteini akutne faze (APP) (1, 4).

APR je kompleksen, skrbno nadzorovan proces, ki vključuje mnoge celice in molekule imunskega sistema, ki lahko imajo več različnih funkcij ter tako sodelujejo oz. dodajo k procesu na več kot en način. Celokupni učinki APR so torej začetek, pomnoževanje in

vzdrževanje vnetnega procesa, ki pa kasneje (po odstranitvi dražljaja) preidejo v zmanjševanje ter popolno razrešitev vnetja (6).

### **1. 3 Proteini akutne faze**

APP so plazemski proteini, katerih koncentracija se med vnetjem zviša ali zniža za vsaj 25 % (6). V glavnem se sintetizirajo v jetrih, pod vplivom vnetnih citokinov, med katerimi so najpomembnejši IL-1, IL-6 in TNF- $\alpha$ . APP so evolucijsko zelo dobro ohranjeni, njihova koncentracija pa se spremeni v nekaj urah po začetku vnetnega odziva, kar skupaj z njihovo kratko življenjsko dobo kaže na pomembno vlogo, ki jo imajo pri obrambi organizma. Delujejo na različne celice, ki sodelujejo v APR, njihov učinek pa je odvisen od časa, molekulske konformacije in koncentracije. Delujejo lahko kot mediatorji vnetja, kadar je antigen prisoten, ali kot zaviralci vnetja, kadar je patogen uspešno odstranjen, posledično pa imajo pomembno vlogo pri regulaciji APR. Njihove do sedaj znane funkcije so prepoznavanje tujih antigenov, opsonizacija, vpliv na mobilizacijo levkocitov, povečanje prepustnosti in razširitev žilja, obnova tkiva, celjenje ran, varovanje pred proteolitičnimi encimi ter reaktivnimi kisikovimi zvrstmi, vezava kovin, prenašanje ali ohranjanje nekaterih (vitalnih) substanc ter sodelovanje pri koagulaciji krvi. Merjenje plazemskih oz. serumskih koncentracij APP je lahko diagnostičnega in/ali prognostičnega pomena, saj odražajo prisotnost ter intenziteto vnetnega procesa. Na njihovo koncentracijo lahko vplivajo tudi nekatera stanja (nosečnost, stres), pridružene bolezni in zdravila, kot so kontracepcija, inzulin in glukokortikoidi. Glede na spremembo koncentracij med APR, lahko APP razdelimo v štiri skupine, natančneje opredeljene spodaj, skupaj z opisi pomembnejših APP, ki smo jih proučevali v magistrski nalogi (7–9).

#### *1. 3. 1 Glavni proteini akutne faze*

Glavnim APP se plazemska koncentracija med APR zveča za več kot 5-krat. Najvidneje zvišana sta serumski amiloid A (SAA) in C-reaktivni protein (CRP), saj njuna koncentracija lahko doseže vrednosti, ki so 1000-kratnik fizioloških (8).

CRP je beta globulin, ki ga uvrščamo v družino pentraksinov. Sem spadajo ciklični neglikozilirani proteini, sestavljeni iz petih identičnih globularnih podenot, ki so med sabo nekovalentno povezane. Podenote CRP imajo 206 aminokislin in so velike 23 kDa ter potrebujejo kalcijeve ione za specifično vezavo ligandov (10, 11). O njegovi sintezi so, poleg glavnega produkcijskega mesta v jetrih, poročali še v limfocitih, alveolnih

makrofagih, nevronih, gladkih mišičnih celicah in tubulnih epitelnih celicah v ledvicah. Protein sodeluje pri prirojenem imunskem odzivu in je zelo pomemben za obrambo gostitelja pred mikroorganizmi. O njegovi pomembnosti priča tudi njegova filogenetska ohranjenost in dejstvo, da je protein brez znanih polimorfizmov pri človeku. CRP ob vezavi liganda (najpogosteje je to fosfoholin, ki je sestavni del membrane patogenov) aktivira klasično pot komplementa, ki vodi do opsonizacije. Na nasprotni strani molekule se nahaja še eno vezavno mesto, ki pa se veže na Fc receptorje celic imunskega sistema in spodbudi fagocitozo vezanega delca. Zaradi zmožnosti odstranjevanja jedrnih ostankov, ki ob apoptozi prav tako izpostavijo molekulo fosfoholina, CRP-ju pripisujejo tudi vlogo pri preprečevanju avtoimunskih odzivov na lastne jedrne antigene (12, 13). V zadnjem času je vse več raziskav, kjer so zaznali njegovo alternativno konformacijo, ki nastane po cepitvi pentamerne oblike v monomerne enote, in jo imenujemo monomerni ali spremenjeni CRP (mCRP). V večji meri so jo zaznali predvsem v aterosklerotičnih žilnih lelah, kjer so že v preteklosti zaznali CRP, vendar s protitelesi, ki so se vezala na obe obliki proteina. Nedavno pa so z bolj specifičnimi protitelesi dokazali, da je v lehi prisotna zgolj monomerna oblika. Predlagana je torej nova paradigma o lokalnih vnetnih učinkih CRP na aktivirane trombocite in apoptozne celice, kjer poteče cepitev v mCRP obliko. Ta naj bi nato spodbujala migracijo in adhezijo monocitov na endotelijske celice, proizvodnjo reaktivnih kisikovih spojin, prehod monocitov v intimo in tvorbo penastih celic, s tem pa prispevala k nadaljnjemu razvoju ateroskleroze (14–16).

Vrednost serumske koncentracije CRP je pomemben laboratorijski označevalec vnetja. Izmerjena koncentracija je sicer zanemarljivo višja pri ženski populaciji, pri celotni populaciji pa se viša s starostjo; manjši dvig koncentracije naj bi kazal tudi na določeno stopnjo žilnega vnetja. Plazemske vrednosti, nižje od 1 mg/ml, kažejo na nizko tveganje, vrednosti 1–3 mg/ml na srednje in vrednosti, višje od 3 mg/ml, na visoko tveganje za razvoj srčno-žilnih bolezni. Pri nekaterih vnetnih boleznih se merjenje koncentracije CRP uporablja tudi kot označevalec aktivnosti bolezni (npr. revmatoidni artritis (RA)), medtem ko pri drugih vnetnih boleznih (npr. sistemski lupus eritematosus (SLE), Sjögrenov sindrom (SjS), ulcerativni kolitis) serumska koncentracija CRP ni vedno povišana (17, 18).

SAA predstavlja družino proteinov, ki imajo 103–104 aminokislino in skupen velik delež homologije v zaporedju, a jih kodirajo različni geni. Pri ljudeh so ti geni štirje: *SAA1*, *SAA2*, *SAA3* in *SAA4*. Kljub nekaterim alelnim razlikam kodirajočih genov so proteini

visoko evolucijsko ohranjeni, tako po zaporedju kot po induktivnih zmožnostih, kar kaže na njihovo pomembno biološko vlogo. Predhodna oblika proteina vsebuje še dodatni signalni peptid, dolg 18 aminokislin, ki ga odcepi signalna peptidaza pred izločanjem v krvni obtok. Pri vnetju sodelujeta predvsem obliki serumskega amiloida A1 (SAA1) in serumskega amiloida A2 (SAA2), saj je *SAA3* psevdogen, serumski amiloid A4 pa je konstitutivno izražen (zaznali so ga tudi v večini preiskovanih tkiv, razen v možganih bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo). Ko torej govorimo o serumskemu SAA, imamo v mislih obliki SAA1 in SAA2, ki sta inducibilna proteina in nastajata v jetrih, njuna koncentracija pa se lahko zviša že 4 ure po prisotnosti ustreznega dražljaja. Zanj so poročane tako vnetne kot protivnetne funkcije: pri fizioloških vrednostih (1–10 µg/ml) deluje kot opsonin za gram negativne bakterije in spodbuja njihovo fagocitozo, pri nekoliko višjih koncentracijah vpliva na izločanje zunajceličnih metaloproteaz, zavira oksidativen izbruh v nevtrofilnih granulocitih in agregacijo trombocitov, kemokinsko in kemotaktično pa spodbuja migracijo levkocitov. Pri še višjih koncentracijah (1000-krat višje vrednosti fizioloških), ki jih najdemo pri patoloških stanjih, vpliva na nevtrofilne granulocite, spodbudi razmnoževanje endotelijskih celic, adhezijo, invazijo in oblikovanje kapilaram podobnih struktur. Med vnetjem povišana koncentracija SAA povzroči tudi preurejanje lipoproteina visoke gostote (HDL), saj zamenja apolipoprotein A-1 v molekuli HDL. Znano je, da SAA vpliva na metabolizem lipidov, vendar natančen učinek še ni popolno pojasnjen. Serumski amiloid A, vezan na lipoprotein visoke gostote (SAA-HDL), naj bi pripomogel k odstranjevanju holesterola s področja vnetja in tako tudi k ohranjanju ter ponovni uporabi holesterola med popravo tkiv po poškodbi. SAA pa je tudi predhodnik amiloida A, ki sestavlja amiloidne depozite pri sekundarni amiloidozi. Pojavijo se kot zaplet nekaterih vnetnih bolezni (oz. kroničnega vnetja), kjer se netopna amiloidna vlakna nalagajo na različnih mestih, vplivajo na strukturo in funkcijo organa, posledično pa povišajo obolevnost in smrtnost. Celokupni učinki SAA so torej odvisni od koncentracije, konformacije, vezave na ligand in mesta, kjer se nahaja, zato prihaja do določenih nesoglasij glede bioloških funkcij, ki jih lahko najdemo v literaturi (19).

Veliko študij, ki proučujejo funkcije SAA, se izvaja z uporabo rekombinantnega proteina SAA1/SAA2, hibrida, ki ima proteinsko strukturo identično alelni variaciji SAA1.1, z izjemo dveh zamenjanih aminokislin na mestih 60 in 71, ki ustrezata molekuli SAA2.2 (tabela I). Ta hibrid se lahko zaradi spremenjene primarne strukture razlikuje tudi v

terciarni in posledično lahko nosi drugačne funkcionalne karakteristike od biološkega proteina (19, 20).

Tabela I: Prikaz proteinskega zaporedja človeških serumskih proteinov SAA1.1 in SAA2.2 ter rekombinantnih proteinov SAA1 in SAA (21)

Protein	Proteinsko zaporedje
SAA1.1	RSFFSFLGEA FDGARDMWRA YSDMREANYI GSDKYFHARG NYDAAKRGPG GVWAAEAISD ARENIQRFFG HGAEDSLADQ AANEWGRSGK DPNHFRPAGL PEKY
SAA2.2	RSFFSFLGEA FDGARDMWRA YSDMREANYI GSDKYFHARG NYDAAKRGPG GAWAAEVISN ARENIQRLTG RGAEDSLADQ AANKWGRSGR DPNHFRPAGL PEKY
rSAA1	MRSFFSFLGEA FDGARDMWRA YSDMREANYI GSDKYFHARG NYDAAKRGPG GVWAAEAISD ARENIQRFFG HGAEDSLADQ AANEWGRSGK DPNHFRPAGL PEKY
rSAA	MRSFFSFLGEA FDGARDMWRA YSDMREANYI GSDKYFHARG NYDAAKRGPG GVWAAEAISN ARENIQRFFG RGAEDSLADQ AANEWGRSGK DPNHFRPAGL PEKY

Določanje serumske koncentracije SAA kot biološkega označevalca vnetja se še ni najbolje uveljavilo, saj pri ljudeh še ni standardizirano, prav tako pa zaradi strukturne podobnosti ne moremo razlikovati med oblikama SAA1 in SAA2. Poročane fiziološke koncentracije SAA se tudi pri zdravih krvodajalcih bistveno razlikujejo in morda je vzrok za razlike vezava proteina na molekulo HDL. Ob medsebojni vezavi bi se lahko namreč prikriili nekateri epitopi, ki jih protitelesa tako ne morejo zaznati in rezultat so nižje izmerjene vrednosti. Pri določenih boleznih, kjer je koncentracija CRP nižja, bi lahko vrednost SAA bolje opredelila prisotnost vnetja. Koncentracija SAA je značilno povišana pri SLE, RA in antifosfolipidnem sindromu (APS), nekoliko manj pri venski trombozi (VT) ter normalna pri arterijski trombozi (AT). Pri virusnih okužbah so nivoji povišanja koncentracij SAA in CRP nižji kakor pri bakterijskih okužbah, vendar je vrednost SAA višja in zato tudi klinično pomembnejša za prepoznavo virusne okužbe (22, 23).

### *1. 3. 2 Zmerno povišani proteini akutne faze*

Tej skupini APP se plazemska koncentracija med APR zviša v manjši meri, za 2–5-krat. S svojim delovanjem pripomorejo k delovanju glavnih APP, obenem pa imajo tudi lastne funkcije, kot so prenašanje steroidov, omejevanje izgub določenih kovinskih ionov in tvorjenje strdkov. V to skupino uvrščamo npr. haptoglobin, fibrinogen, fibronektin, plazminogen, alfa 1-antitripsin (A1AT), alfa 1-kisli glikoprotein (A1AG1) in vitronektin (VTNC) (8).

A1AT je glikoziliran serumski protein, ki razen v jetrih nastaja še v monocitih, makrofagih, v nekaterih tkivih in tudi v nekaterih tumorskih celicah. Sestavlja ga 394 aminokislin, ki skupno tvorijo molekulska maso 46 kDa. Ker ima več lizinskih aminokislin na površini molekule, se zlahka karbamilira – tvori kovalentno vez med izociansko kislino (HCNO) in amsko skupino lizina (NH<sub>2</sub>). Proti karbamilirani obliki so zaznali avtoprotitelesa pri bolnikih z RA in v manjši meri tudi pri zdravih krvodajalcih. Karbamiliran protein je zelo verjetno encimsko neaktiven in tako ne more izkazovati svojih varovalnih funkcij – aktiven protein namreč varuje tkiva pred zunajceličnim proteolitičnim delovanjem, saj zavira serinske proteaze, ki jih izločajo nevtrofilni granulociti med vnetnim odzivom. Sodeluje tudi pri regulaciji metabolizma železa, saj inducira izražanje receptorjev za transferin in feritin. Sinteza A1AT je sicer tudi ob odsotnosti vnetja visoka, saj se sintetizira vsakodnevno, zaznamo pa ga lahko tudi v drugih bioloških tekočinah (npr. v slini, solzah, spermi, žolču). Serumsko koncentracijo še dodatno zviša uporaba zdravil, kot so oralni kontraceptivi, ali nosečnost. Na drugi strani pa znižane serumske vrednosti proteina povezujejo z večjim tveganjem za razvoj pljučnega emfizema, ciroze jeter, RA, SLE in sistemskega vaskulitisa. Celokupna vloga A1AT še ni povsem znana, domneva pa se, da promovira preklon med vnetno in protivnetno potjo, ki je pomembna za razrešitev vnetja (11, 24, 25).

A1AG1 je protein, ki spada v družino imunokalinov. Njihova funkcija je prenos majhnih hidrofobnih komponent in sodelovanje pri vnetnem odzivu imunskega sistema. Točna funkcija A1AG1 pri APR ostaja nejasna, znano pa je, da zavira nastanek superoksidnih radikalov in razmnoževanje limfocitov, spodbuja nastajanje topnih receptorjev za TNF- $\alpha$  ter antagonistov receptorjev za IL-1. Protein sestavlja enoverižna polipeptidna veriga iz 183 aminokislin, z molekulska maso 21 kDa in 5. možnimi glikozilacijskimi mesti. Identificiranih je 5 različnih glikanov, topnost molekul pa je zelo visoka. Učinek proteina



je odvisen od več parametrov: tipa celic, na katere deluje, glikozilirane strukture in celokupne koncentracije oz. prisotnosti dražljaja. Za razliko od A1AT je koncentracija A1AG1 pri uporabi oralnih kontraceptivov in med nosečnostjo znižana, medtem ko je zvišana pri aterosklerozi, RA in SLE (10, 11, 26).

VTNC, ki je znan tudi kot S-protein, je glikoprotein, sestavljen iz 459 aminokislin z molekularno maso 75 kDa. V plazmi ga, v odvisnosti od fenotipa, lahko najdemo v dveh oblikah: kot eno verigo (75 kDa) ali kot dve verigi (10 in 65 kDa), ki sta skrajšani in povezani z disulfidno vezjo. Razmerje med obema oblikama je genetsko pogojeno in odvisno od aminokislina na 381. mestu. Proizvajajo ga jetrne celice, ki ga izločajo v plazmo, nekaj pa ga nastaja tudi v medceličnem prostoru in trombocitih. Skoncentriranega najdemo v tkivih na področju skleroze, nekroze in aterosklerotičnih plakov, kjer bi ob patofizioloških pogojih tkiva morda lahko prišlo do povečane lokalne sinteze proteina. Strukturno gre za labilno molekulo in sklepamo lahko, da so njegove biološke funkcije odvisne od konformacijske oblike. V plazmi se nahaja v obliki monomera; konformacijsko spremenjena oblika, ki omogoča hitro sproščanje v krvni obtok, pa se nahaja v trombocitih. VTNC lahko veže več različnih ligandov, kot so npr. integrini, inhibitor aktivatorja plazminogena (PAI-1), urokinazni receptor, kolagen, heparin in nekatere komponente komplemента. Po velikem številu različnih vezavnih mest lahko sklepamo, da ima vlogo pri regulaciji več bioloških procesov – omogoča namreč pritrditev celic na njihov okoliški matriks, sodeluje pri celični morfogenezi in diferenciaciji. Pomembno vlogo ima tudi pri odzivu krvnih žil na poškodbo, saj regulira nastanek strdka s posredovanjem adhezije in agregacije trombocitov na mesta poškodbe žilja, po drugi strani pa regulira tudi odstranitev strdka z vezavo in stabilizacijo PAI-1, kar podaljša njegovo obstojnost in posledično regulira fibrinolizo. Vključen je tudi v vezavo nekaterih bakterij, aktivacijo komplemента, celjenje ran, angiogenezo in popravo tkiva. VTNC podobne molekule so zaznali tudi pri rastlinah, algah, insektih in nižjih vretenčarjih, kar kaže na evolucijsko ohranitev in pomembne biološke funkcije proteina. Serumsko koncentracija je običajno zvišana pri bolnikih s koronarno arterijsko boleznijo in SLE (27–30).

### *1. 3. 3 Rahlo povišani proteini akutne faze*

Tem APP-jem se plazemske vrednosti med APR povišajo za 0,5 do 1-krat. Pri določenih vnetnih boleznih, kot je npr. Stillova bolezen, pa lahko izjemoma dosežejo tudi višje vrednosti. Med rahlo povišane APP med drugim štejemo feritin in ceruloplazmin (8).

### *1. 3. 4 Znižani proteini akutne faze*

V to skupino spadajo plazemski proteini, katerih koncentracija se med APR zniža za več kot 25 %. Funkcionalnost te spremembe še ni točno določena, vendar sklepamo, da je posledica povečanja potreb po gradnikih za proteine, katerih koncentracija se med vnetjem zviša. Znižani APP najverjetneje nimajo pomembnejše vloge pri sami obrambi gostitelja, zato se njihova sinteza v tem obdobju zmanjša. Med znižane APP tako uvrščamo albumin, transferin, apolipoprotein A1 in faktor XII (6).

Albumin je globularni protein, sestavljen iz ene verige s 585 aminokislinami in skupno molekularno maso 66 kDa. Predstavlja več kot 50 % vseh plazemskih proteinov in je zelo pomemben pri uravnavanju onkotskega tlaka. Ker se med APR vrednosti ostalih APP povečajo, je potreba po uravnavi onkotskega tlaka velika, zato pride do zmanjšanja sinteze albumina. Pomemben je tudi zaradi varovanja pred oksidativnim stresom in vezave oz. prenosa različnih snovi. Zaradi amino skupine na površini molekule lahko pride do ne-encimske glikacije, ki pa lahko spremeni sekundarno oz. terciarno strukturo proteina in posledično tudi funkcionalnost ter morebitno imunološko aktivnost (31).

### **1. 4 Kronično vnetje in avtoimunske bolezni**

Ustrezno uravnano in pravočasno sproženo vnetje ohranja zdravje, zato po odstranitvi antigena praviloma sledi razrešitev APR, pri tem pa se plazemske koncentracije APP vrnejo nazaj na bazalne vrednosti. Trajajoče vnetje in neuspešna razrešitev APR dolgoročno lahko povzročita poškodbe tkiva. Kadar imunski sistem dlje časa ni zmožen odstraniti antigena, ali pa pride do več zaporednih dražljajev v krajšem časovnem obdobju, je vzpostavitev homeostaze otežena in razrešitev vnetja ni možna (8). Imunske celice neprekinjeno izločajo citokine, ki spodbujajo vnetje, aktivacijo makrofagov in spremenjene koncentracije APP. Takemu stanju pravimo kronično vnetje, ki vodi v okvare tkiv in organov, pospešena pa je tudi patogeneza določenih bolezni (32).

Kronično vnetje pa je lahko tudi posledica avtoimunskih bolezni. Avtoimunost definiramo kot imunsko reakcijo, usmerjeno proti lastnim antigenom. Pri zdravih posameznikih je imunski sistem tolerant do lastnih celic oz. antigenov, napada pa tuje sestavne dele bakterij in virusov. Zmožnost razlikovanja med lastnimi in tujimi antigeni je določni dejavnik sposobnosti imunskega sistema, saj diskriminacija omogoča prepoznavo okužbe. Avtoimunska bolezen predstavlja motnjo v mehanizmih uravnavanja aktivnosti imunskega

sistema, efektorski mehanizem odstranjevanja avtoantigenov pa je enak tistemu, ki odstranjuje tuje antigene. Gre torej za napad na gostitelja, ki je posredovan s strani protiteles, imenovanih avtoprotitelesa. Antigenska specifičnost teh je uporabna pri klinični diagnostiki avtoimunskih bolezni, čeprav so nekatera avtoprotitelesa zaznali tudi pri zdravih posameznikih, vendar so pri njih v manjšem številu in nižje afinitete. Za razliko od infekcijskih antigenov avtoantigenov ni mogoče v celoti odstraniti, zato je bolezen aktivna zelo dolgo oz. skozi celotno življenjsko dobo. Za razvoj so odgovorni genetski in okoljski dejavniki; najverjetneje je, tako kot pri alergijah, za sprožitev bolezni potreben vpliv več okoljskih faktorjev v zaporedju ali sočasno. Iz teh razlogov je patogenezo avtoimunskih bolezni težko pojasniti – pri večini namreč še ni bilo določeno, ali so avtoprotitelesa vzrok ali posledica bolezni (2, 5).

### **1. 5 Avtoprotitelesa proti proteinom akutne faze**

Avtoprotitelesa proti proteinom akutne faze (anti-APP) so bila že identificirana, vendar njihova vloga še vedno ni natančno pojasnjena. Na eni strani jih uvrščajo med naravna protitelesa, saj so nekatera prisotna v serumih zdravih ljudi in naj bi imela varovalno vlogo pri obrambi gostitelja pred patogeni ter pri odstranjevanju spremenjenih oz. nefunkcionalnih serumskih proteinov (avtoprotitelesa proti CRP, SAA in albuminu) (33). Na drugi strani pa so višje koncentracije določenih anti-APP našli pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi, kot so SLE (avtoprotitelesa proti A1AT, CRP), APS (avtoprotitelesa proti VTNC, faktorju XIII, plazminogenu) in RA (avtoprotitelesa proti CRP, feritinu, fibronektinu), kar bi lahko nakazovalo tudi na njihovo morebitno vlogo pri patogenezi bolezni. Avtoprotitelesa proti APP imajo dokazano višjo vezavno aktivnost pri bolnikih s sistemskimi boleznimi (SLE in SSc) kot tista pri bolnikih, kjer ni sistemske vpletenosti. Pri nobenem APP pa zaenkrat še ni bilo ugotovljene povezave med koncentracijo antigena (APP) in avtoprotitelesa, usmerjenega proti njemu (anti-APP) (34, 35).

Bolniki s SLE nimajo značilno povišanih koncentracij CRP v času aktivne bolezni, medtem ko so avtoprotitelesa usmerjena proti CRP pri teh bolnikih povišana v primerjavi z zdravimi. Sicer naj bi avtoprotitelesa proti CRP-ju prepoznala spremenjeno monomerno obliko, ki pa ima različno aktivnost v primerjavi s pentamerno obliko (18). Tudi vrednosti avtoprotiteles proti A1AT so povišane pri SLE, zato predvidevajo, da naj bi imela enak učinek kot genetsko pomanjkanje proteina (33). Zanimivo pa so bili nivoji avtoprotiteles

proti SAA (anti-SAA) višji pri krvodajalcih kot pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi (22). Ravno zaradi tega raziskovalci domnevajo, da imajo anti-SAA zaščitno vlogo in spadajo med naravna protitelesa. Sklepajo, da bi lahko vsa anti-APP imela zaščitno vlogo in pomagala pri zniževanju APP na fiziološko vrednost med razrešitvijo akutne faze, čeprav so identificirali tudi avtoprotitelesa proti znižanim APP, katerim enake vloge ne moremo pripisati (33).

## **1. 6 Naravna protitelesa**

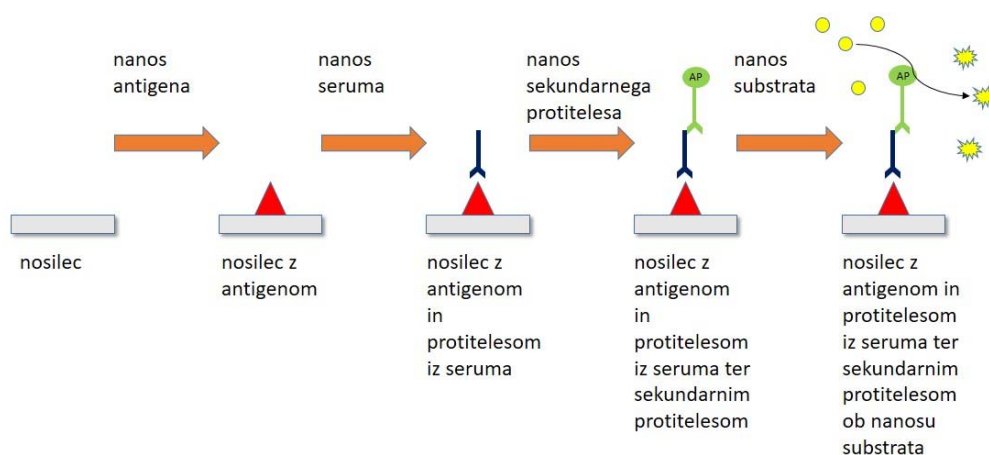
Proti koncu 20. stoletja so v krvnem obtoku zdravih prostovoljcev zaznali prisotnost več protiteles, ki so se vezala na različne tuje in tudi lastne antigene. Čeprav so bila podobna tistim pri avtoimunskih boleznih, pa so se razlikovala glede koncentracije in fine specifičnosti za epitope. Zaradi njihove stalne prisotnosti v krvi in nastajanja, neodvisnega od izpostavljenosti tujim antigenom oz. znane ali namerne imunizacije, so jih poimenovali naravna protitelesa (34). Kasneje so ugotovili, da so prvinski del imunskega sistema, ki je ostal ohranjen skozi evolucijo in da izvirajo iz celic limfocitov B1. Ta tip celic predstavlja večinsko sestavo limfocitov pri zarodku in novorojenčku, saj naj bi se preko placentne prenesel od matere in deloval kot matrika za nastanek repertoarja naravnih protiteles in razvoj ostalih celic B pri otroku (36). Številčno povečanje celic B1 so zaznali tudi pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi, vendar pa so odkrili tudi značilno znižane vrednosti avtoprotiteles proti vnetnim molekulam, kot so TNF- $\alpha$ , IL-6 in CRP. Sinteza naravnih protiteles je programirana s strani konstitutivno izraženih imunoglobulinskih (Ig) genov, ki pa so skoraj brez somatskih mutacij. Večinsko so tipa IgM, s splošno nizko vezavno afiniteto in polireaktivnostjo, vendar so prisotna tudi poli- ter mono-reaktivna naravna protitelesa izotipa IgA in IgG. V prvi vrsti imajo vlogo pri obrambi organizma pred okužbami, saj zaradi konstitutivne in torej še pred okužbo obstoječe prisotnosti ter široke reaktivnosti z raznolikimi komponentami mikrobov zagotavljajo osnovno zaščito organizma v času, ki je potreben za aktivacijo pridobljenega imunskega odziva. Poleg tega sodelujejo tudi pri odstranjevanju mrtvih oz. apoptotičnih celic, saj se vežejo na delce jedra in deoksiribonukleinske kisline (34). Nizka stopnja avtoimunosti je torej fiziološka, vendar pa je verjetno povezana z nastankom patoloških avtoprotiteles v večjem obsegu, do katerega pride pri genetsko dovzetnih posameznikih pod vplivi okoljskih dejavnikov in se izraža v nastanku avtoimunskih boleznih. Domneva se, da so prisotna naravna protitelesa proti vsem endogenim antigenom v nizkih koncentracijah. Repertoar do sedaj zaznanih

naravnih protiteles je pri zdravih posameznikih različne starosti in spola namreč zelo konstanten; prisotne so le minimalne individualne razlike. Dokazano je, da se koncentracija naravnih protiteles spremeni zaradi patofizioloških sprememb v sintezi ali razgradnji endogenih komponent, ki pa se pojavijo že v predklinični fazi motnje. Predlagana je določitev sestave fiziološkega repertoarja naravnih protiteles, ki bi nato služila kot referenca za analizo serumov posameznikov in diagnostiko morebitnih začetkov bolezni še pred razvojem kliničnih znakov. Naravna protitelesa bi lahko imela tudi terapevtski potencial pri pospeševanju odstranjevanja proteinov ali za zdravljenje določenih vnetnih bolezni (37). Trenutno se namreč že uporabljajo IgG, izolirani iz plazme velikega števila zdravih krvodajalcev, in sicer kot pripravki za intravensko ali podkožno aplikacijo. Gre za terapijo pri določenih avtoimunskih boleznih (npr. Kawasakijska bolezen) in imunskih pomanjkljivostih, ki pa je tudi že v kliničnih testiranjih za druge imunološke indikacije (38).

### **1. 7 Encimsko-immunske metode za določitev serumskih protiteles**

Izraz imunska analiza (angl. *immunoassay*) se uporablja za analize, pri katerih pride do specifične vezave med antigenom in protitelesom. Te vrste analize se uporabljajo tako v rutinskih testih kot v raziskovalne namene. Omogočajo širok izbor označevalnih substanc, kot so npr. encimi, fluorescenčne ali luminiscenčne molekule, obarvani mikrodelci in radioaktivni izotopi, ki omogočajo detekcijo tvorjenega kompleksa med protitelesom in antigenom (5). Encimsko-immunske tehnike so bile prvič zabeležene leta 1966, ko so encim hrenove oksidaze uspeli konjugirati z Ig (39). Temeljijo na reakciji encima, ki je vezan na protitelo, in dodanega brezbarvnega substrata, pri čemer nastane obarvan produkt, ki mu lahko določimo intenziteto obarvanja (32). Reakcija omogoča semikvantitativno ali kvantitativno določitev protiteles oz. antigena v vzorcu, njena prednost pa je trajno obarvanje, ki omogoča kasnejši pregled in vizualno ovrednotenje pod svetlobnim mikroskopom, s spektrofotometrom ipd. Ostale prednosti encimsko-immunskih metod so še visoka specifičnost in občutljivost, relativna hitrost izvedbe analize, možnost avtomatizacije procesa, ponovljivost rezultatov ter cenovna dostopnost. Slabosti metode pa so vezane predvsem na reagente – nespecifičnost sekundarnega protitelesa za antigen, nespecifična vezava in morebitna slaba kvaliteta ter čistost encimsko označenih protiteles. Obstajajo zelo raznolike prilagoditve analiz, ki jih lahko razdelimo na homogene in heterogene, slednje pa naprej na kompetitivne in nekompetitivne. Pri homogenih metodah

se kompleksi protitelo-antigen tvorijo v tekoči fazi, medtem ko je pri heterogeni metodi antigen ali protitelo vezano na trdno podlago. Nekompetitivna metoda je v primerjavi s kompetitivno časovno daljša, vendar je bolj občutljiva za določanje manjših koncentracij analita. Pri indirektni nekompetitivni metodi je po imobilizaciji antigena na trdno podlago potrebno blokirati nevezana mesta, sledi dodatek redčenih vzorcev s preiskovanimi protitelesi, ki se vežejo na antigen. Nevezana protitelesa odstranimo s spiranjem in dodamo encimsko označena sekundarna protitelesa, usmerjena proti primarnim. S spiranjem ponovno odstranimo nevezana sekundarna protitelesa, čemur sledi še zadnji korak – dodatek substrata. Pri direktni nekompetitivni metodi pa v vzorcu določamo količino antigena; na podlagi so imobilizirana protitelesa, sledi dodatek preiskovanega vzorca, ki vsebuje antigen, in sekundarnih protiteles proti antigenu, ki se vežejo na drugačen epitop kot primarna protitelesa. Pri obeh opisanih nekompetitivnih metodah se meri encimska aktivnost sekundarnih protiteles, količina nastalega obarvanega produkta pa je sorazmerna s koncentracijo encima in posredno tudi s koncentracijo preiskovanega analita. Princip heterogene nekompetitivne indirektno vezave, ki smo ga uporabili pri metodah v tej nalogi, je prikazan na sliki 1 (39, 40).



Slika 1: Princip heterogene nekompetitivne indirektno encimsko-immunske metode

## 2 NAMEN DELA

APR je odziv organizma na poškodbe ali okužbe, med katerim se poveča sinteza APP. Pri zdravih posameznikih pride po odstranitvi dražljaja do razrešitve APR in znižanja koncentracije APP nazaj na fiziološki nivo, pri bolnikih s sistemskimi vnetnimi boleznimi pa je vnetje kronično z dolgotrajno povišanimi vrednostmi APP in drugimi vnetnimi parametri, kar lahko vodi v poškodbe tkiv in dodatne zaplete bolezni (npr. aterogeneza in srčno-žilne bolezni). Mehanizmi razrešitve APR še niso pojasnjeni, vendar bi pri tem lahko imela vlogo tudi anti-APP, ki so jih že zaznali v serumih bolnikov z vnetnimi boleznimi in zdravih krvodajalcev. Le-ta bi z vezavo na APP lahko pripomogla k njihovem učinkovitejšemu odstranjevanju iz telesa in/ali preprečila nekatere njihove dolgoročno škodljive funkcije. Določitev prisotnosti oz. nivojev avtoprotiteles proti različnim APP v serumih bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi in srčno-žilnimi boleznimi ter primerjava z zdravimi krvodajalci bi nam omogočila vpogled v pomembnost anti-APP tako pri patoloških kot tudi fizioloških pogojih. V prihodnosti bi nam potencialno lahko služila tudi kot pomoč pri diagnozi in prognozi bolezni ali celo kot terapija pri bolnikih z vnetnimi boleznimi.

Namen naloge je preveriti prisotnost in (semi-)kvantitativno določiti nivoje avtoprotiteles proti nekaterim APP (SAA, SAA1, SAA-HDL, CRP, A1AG1, VTNC, A1AT in albumin) v serumih zdravih krvodajalcev, bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi (vaskulitis povezan s protitelesi proti citoplazmi nevtrofilcev (AAV), zgodnji revmatoidni artritis (eRA), gigantocelični arteritis (GCA), sistemska skleroza (SSc), SjS, SLE in APS) in srčno-žilnimi boleznimi (srčno popuščanje (SP), VT in AT) z uporabo encimsko-imunskih metod (metoda točkovnega prenosa (DB), encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu (ELISA) in ločitev s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE) s prenosom po Westernu).

Naši postavljeni cilji so torej sledeči:

- določitev prisotnosti in semikvantitativna določitev nivojev avtoprotiteles proti nekaterim APP (SAA, SAA1, CRP, A1AG1 in VTNC) s pomočjo metode DB v serumih zdravih krvodajalcev, bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi in srčno-žilnimi boleznimi;

- kvantitativna določitev nivojev avtoprotiteles proti nekaterim APP (SAA, SAA1 in SAA-HDL) z metodo ELISA v serumih zdravih krvodajalcev, bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi in srčno-žilnimi boleznimi;
- ločitev nekaterih APP (albumin, A1AT in CRP) od morebitnih nečistot s SDS-PAGE in prenosom po Westernu, kvalitativno ovrednotenje prisotnosti avtoprotiteles v serumih zdravih krvodajalcev, bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi in srčno-žilnimi boleznimi in
- statistična analiza pridobljenih podatkov.



## **3 MATERIALI IN METODE**

### **3.1 Humani serumi**

Serume zdravih krvodajalcev, bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi in srčno-žilnimi boleznimi smo pridobili iz obstoječih bank Laboratorija za imunologijo revmatizma Kliničnega oddelka za revmatologijo SPS Interne klinike UKC Ljubljana. V raziskavo smo tako vključili serume naslednjih preiskovancev:

- zdravi krvodajalci (n = 11),
- bolniki z GCA (n = 11),
- bolniki z AAV (n = 10),
- bolniki s SSc (n = 10),
- bolniki s SLE (n = 10),
- bolniki z eRA (n = 10),
- bolniki z APS (n = 10),
- bolniki s SjS (n = 9),
- bolniki s SP (n = 10),
- bolniki z VT (n = 10) in
- bolniki z AT (n = 10).

### **3.2 Antigeni**

- Albumin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, MO, ZDA.
- A1AT, Abcam, Cambridge, VB.
- A1AG1, Novusbio (Biotechne), MN, ZDA.
- CRP, Novusbio (Biotechne), MN, ZDA.
- SAA, PeproTech, NY, ZDA.
- SAA1, PeproTech, NY, ZDA.
- SAA-HDL, PeproTech, NY, ZDA.
- VTNC, PeproTech, NY, ZDA.

### 3. 3 Konjugati

- Z alkalno fosfatazo konjugirana kozja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG, specifična za Fc fragment; BioRad, CA, ZDA.
- Z alkalno fosfatazo konjugirana kozja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG, specifična za Fc fragment; Axell, NY, ZDA.

### 3. 4 Kemikalije

- Akrilamid/Bisakrilamid, 30 % raztopina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija.
- Amonijev persulfat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija.
- Bromfenolmodro, Riedel de Haen, Nemčija.
- Dietanolamin ( $\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_2$ ), MP Biomedicals, Francija.
- Dinatrijevhidrogenfosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), Fagron Hellas, Grčija.
- Glicerol, Lex, d. o. o., Slovenija.
- Glicin, analitska čistost.
- Goveji serumski albumin (BSA, Bovine serum Albumin), Sigma-Aldrich Co., ZDA.
- Kalijev klorid (KCl), analitska čistost.
- Kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), EMSURE, Merck KGaA, Nemčija.
- Klorovodikova kislina (HCl), analitska čistost.
- Magnezijev klorid heksahidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), analitska čistost.
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), analitska čistost.
- Natrijev azid ( $\text{NaN}_3$ ), Merck KGaA, Nemčija.
- Natrijev hidroksid (NaOH), analitska čistost.
- Natrijev klorid (NaCl), analitska čistost.
- Natrijev lavrilsulfat ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$ ), elektroforezna čistota, Bio-Rad, ZDA.
- Označevalec molekulske mase BlueRanger®, Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix, Pierce, Thermo Scinetific, ZDA.
- TEMED, Bio-Rad, ZDA.
- Tris (hidroksimetil)aminometan, Kemika, Hrvaška.

- Tween 20, Polyethylene glycol sorbitan monolaurate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija.
- Para-nitrofenil-fosfat tablete, Sigma-Aldrich Co., ZDA.
- Posneto mleko v prahu, živilski izdelek, Pomurske mlekarne, Murska Sobota, Slovenija.
- 1-step NBT/BCIP, Thermo Scientific, ZDA.
- 2-merkaptotetanol (HO(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)SH), Merc KGaA, Nemčija.

### 3. 5 Pufri

#### 3. 5. 1 Pufri za metodo točkovnega prenosa

- S fosfatom pufrana fiziološka raztopina (PBS, pH = 7,4)
  - Natrijev klorid (NaCl) 8,0 g
  - Kalijev klorid (KCl) 0,2 g
  - Dinatrijevhidrogenfosfat dihidrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O) 1,15 g
  - Kalijev dihidrogenfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,2 g
  - Destilirana voda (dH<sub>2</sub>O) do 1000 ml
  - Uravnava pH na 7,4 z 2 M natrijevim hidroksidom (NaOH)
- S Trisom pufrana fiziološka raztopina (TBS, pH = 7,4)
  - Tris (hidroksimetil)aminometan 0,605 g
  - Natrijev klorid (NaCl) 4,385 g
  - Destilirana voda (dH<sub>2</sub>O) do 500 ml
  - Uravnava pH na 7,4 z 2 M klorovodikovo kislino (HCl)
- TBS + 0,1 % Tween 20 pufer
  - Tween 20 0,5 g
  - TBS (pH = 7,4) do 500 ml
- Pufer za blokado (5 % mleko v TBS + 0,1 % Tween 20)
  - Posneto mleko 5 g
  - TBS + 0,1 % Tween 20 pufer do 100 ml

### 3. 5. 2 Pufri za encimsko-imunsko metodo na trdnem nosilcu

- S fosfatom pufrana fiziološka raztopina (PBS, pH = 7,4)
  - Natrijev klorid (NaCl) 8,0 g
  - Kalijev klorid (KCl) 0,2 g
  - Dinatrijevfosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) 1,15 g
  - Kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,2 g
  - Destilirana voda ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) do 1000 ml
  - Uravnava pH na 7,4 z 2 M natrijevim hidroksidom (NaOH)
  
- PBS + 1 % BSA
  - Goveji serumski albumin (BSA) 0,25 g
  - PBS pufer 25 ml
  
- PBS + 0,1 % Tween 20
  - Tween 20 0,5 g
  - PBS pufer do 500 ml
  
- PBS + 0,1 % Tween 20 + 1 % BSA
  - Goveji serumski albumin (BSA) 0,25 g
  - PBS + 0,1 % Tween 20 pufer 25 ml
  
- Dietanolaminski pufer (DEA, pH = 9,8)
  - Demineralizirana voda ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) 320 ml
  - Magnezijev klorid ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0,05 g
  - Natrijev azid ( $\text{NaN}_3$ ) 0,10 g
  - Dietanolamin ( $\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_2$ ) 51,0 g
  - Uravavanje pH z 2 M HCl do 9,8 ~ 37,5 ml
  - Demineralizirana voda ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) do 500 ml

### 3. 5. 3 Pufri za poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata

- Ločitveni gel
  - Akrilamid/bisakrilamid 2,34 ml
  - 10 % natrijev lavrilsulfat 70  $\mu$ l
  - 1,5 M Tris (hidroksimetil)aminometan (pH = 8,8) 1,76 ml
  - Destilirana voda 2,88 ml
  - 10 % amonijev persulfat 42  $\mu$ l
  - TEMED 84  $\mu$ l
  
- Koncentracijski gel
  - Akrilamid/bisakrilamid 0,64 ml
  - 10 % natrijev lavrilsulfat 48  $\mu$ l
  - 0,5 M Tris (hidroksimetil)aminometan (pH = 6,8) 1,20 ml
  - Destilirana voda 2,816 ml
  - 10 % amonijev persulfat 10  $\mu$ l
  - TEMED 20  $\mu$ l
  
- Spodnji pufer za elektroforezo
  - Tris (hidroksimetil)aminometan 3 g
  - Glicin 14,5 g
  - Destilirana voda do 1100 ml
  
- Zgornji pufer za elektroforezo
  - Tris (hidroksimetil)aminometan 30 g
  - Glicin 145 g
  - Destilirana voda do 1000 ml
  - 10 % natrijev lavrilsulfat 10 ml
  
- Pufer za vzorce
  - 0,25 M Tris (hidroksimetil)aminometan (pH = 6,8)

- Pufer za prenos proteinov po Westernu
  - Glicin 72 g
  - Tris (hidroksimetil)aminometan 15 g
  - Metanol 1000 ml
  - Destilirana voda 5000 ml
  - Dodatek 10 % natrijevega lavrilsulfata pred uporabo 9 ml

### 3. 6 Aparature in pribor

- Drobní laboratorijski pribor in oprema (pipete, multipipete, nastavki za pipete, kadičke, steklovina, stančevina, plastične epice ...).
- Nitrocelulozna membrana z velikostjo por 0,45  $\mu\text{m}$  Thermo Scientific, Nemčija.
- Plošča Costar 3590, 96 well EIA/RIA plate, high binding, Corning Incorporated, ZDA.
- Tehtnica Mettler Toledo PM2500 Delta Range, Švica.
- pH meter Mettler Toledo SevenEasy, ZDA.
- Stresalnik Cleaver Scientific Ltd, Rocker Shaker, Velika Britanija.
- Vibracijsko mešalo Assister Karl Hecht KG, Nemčija.
- Spektrofotometer Tecan Sunrise Remote, Avstrija.
- G:BOX, Syngene, Velika Britanija.
- Programska oprema za slikanje nitrocelulozne membrane GeneSys (verzija V1.5.7.0).
- Programska oprema za obdelavo slike nitrocelulozne membrane GeneTools from Syngene (verzija 4.03.05.0).

### 3. 7 Metoda točkovnega prenosa

Iz nitrocelulozne membrane smo najprej izrezali trakove velikosti 8 x 0,5 cm. Razporedili smo jih na podlogo z merilom, tako da smo lahko na vsak trak s pipeto nanесли raztopine izbranih proteinov na razdalji 1 cm. Volumen nanosa raztopine antigena je znašal 1  $\mu\text{l}$ , s koncentracijo 0,5 ali 1 mg/ml. Trakove smo pustili, da so se posušili in jih nato prenesli v plastično kadičko z 12 vdolbinami. V vsako izmed vdolbin smo previdno dodali 1 ml pufera za blokado, in sicer tako, da nismo s premočnim curkom pipete poškodovali membrane. Inkubirali smo eno uro pri sobni temperaturi in na stresalniku s hitrostjo desetih streslajev na minuto. Nato smo pufer za blokado odlili in membrane narahlo sprali z destilirano vodo.

V vdolbinice smo dodali po 1 ml posameznega seruma, ki smo ga predhodno redčili v pufru za blokado, v razmerju 1 : 50 (980  $\mu$ l pufru za blokado in 20  $\mu$ l seruma). Pri redčenju smo pazili, da smo vzorce zadostno odtalili in premešali ter da jih nismo medsebojno kontaminirali. Po dodatku serumov smo ponovno inkubirali 1 uro pri enakih pogojih. Serume smo nato odstranili iz kadičke z vakuumsko črpalko – tako smo se izognili prenosu serumov med posameznimi membranami. Sledilo je večkratno spiranje, vsakokrat z volumnom 1 ml na vdolbinico, in sicer dvakrat 5 minut s pufrom za blokado, dvakrat 5 minut s TBS + 0,1 % Tween 20 pufrom in še enkrat 5 minut s TBS pufrom. Med spiranjem smo kadičko vsakokrat položili na stresalnik. Po spiranju smo v vdolbinice dodali 1 ml sekundarnega protitelesa (z alkalno fosfatazo konjugirana kozja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG, specifična za Fc fragment, BioRad), redčenega v pufru za blokado, v razmerju 1 : 1000. Inkubacija je ponovno potekala pri sobni temperaturi in na stresalniku, le da je tokrat trajala 30 minut. Zopet je sledilo večkratno spiranje s 5-minutno inkubacijo na stresalniku – dvakrat s pufrom za blokado, trikrat s TBS + 0,1 % Tween 20 pufrom ter enkrat s TBS pufrom. Zadnji korak je bil dodatek substrata 1-STEP NBT/BCIP (1 ml v posamezno vdolbinico) in inkubacija do dokončne intenzitete obarvanja posameznih lis na membrani (5–10 min). Trakove smo le še sprali z destilirano vodo in jih posušili, preden smo določali intenziteto obarvanih točk z aparatom G:BOX.

Pri vsakokratni analizi smo v prvo vdolbinico v kadički dali izbrani serum (standard), za katerega smo predhodno vedeli, da daje visoko pozitivne rezultate. Tako smo lahko rezultate, dobljene pri različnih analizah, standardizirali glede na rezultat standarda. Na ta način smo zmanjšali morebitne medanalizne razlike. V zadnjo (dvanajsto) vdolbinico pa smo vsakokrat namesto seruma dodali 1 ml pufru za blokado, kar nam je služilo kot slepi vzorec, kamor naj se substrat ne bi (specifično) vezal.

Po izvedeni analizi smo dobljene rezultate pretvorili v sliko s pomočjo aparata G:BOX in programa GeneSys. Nadalje smo s programom GeneTools ročno označili posamezne točkovne odzive, ki so bili vidni na sliki vzorcev. Tako pridobljenim področjem je program določil izvorni obseg (RV, angl. *Raw volume*) glede na površino signala in njegovo intenziteto (povprečna vrednost pikslov). V neposredni bližini signala smo označili še področje ozadja, saj so bile posamezne membrane na področjih, kjer ni bilo antigena, različno obarvane zaradi nespecifičnih vezav snovi iz seruma. Vrednost RV ozadja smo odšteli od RV signala vzorca. Nekateri proteini (npr. SAA-HDL, CRP, A1AG1 in A1AT)

so dajali rahel signal tudi na slepem vzorcu – tudi tem smo določili vrednosti RV, jim odšteli ozadje in dobljeno vrednost nato odšteli od vrednosti vzorca (enačba 1).

$$\text{Intenziteta obarvanja} = (RV_{\text{vzorca}} - RV_{\text{ozadja vzorca}}) - (RV_{\text{slepe}} - RV_{\text{ozadja slepe}}) \quad \text{Enačba 1}$$

Pridobljene vrednosti intenzitete obarvanja smo nato pretvorili v arbitrarne enote glede na vrednost standarda pri vsaki posamezni analizi, kateremu smo pripisali vrednost 100 AE (enačba 2).

$$AE_{\text{vzorca}} = \frac{\text{Intenziteta obarvanja} * 100}{RV_{\text{standarda}}} \quad \text{Enačba 2}$$

### 3. 8 Encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu

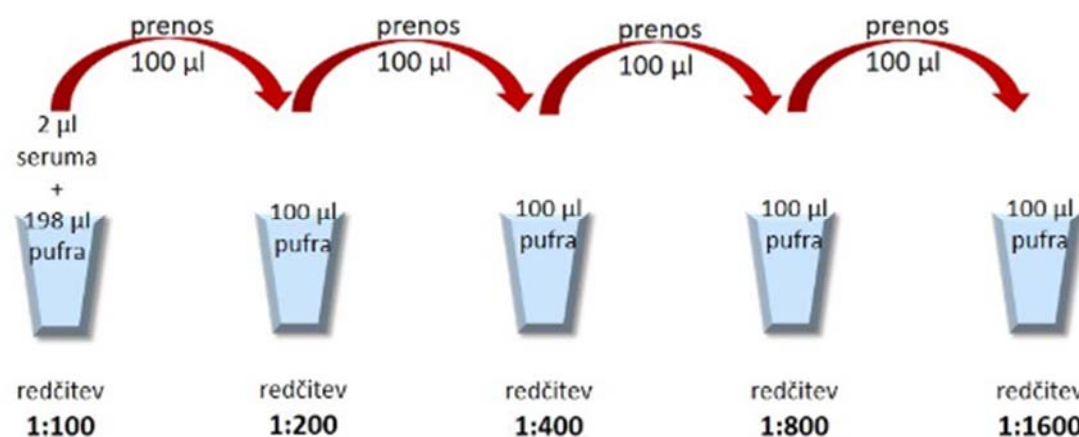
Na ploščico z visoko vezavno kapaciteto (Costar High Binding 3590) smo v vsako izmed 96 vdolbin s pomočjo multipipete nanесли 50  $\mu\text{l}$  antigena s koncentracijo 4  $\mu\text{g/ml}$ . To raztopino smo pripravili tako, da smo 20  $\mu\text{l}$  antigena s koncentracijo 1  $\text{mg/ml}$  dodali v 5 ml PBS. Tako pripravljeno ploščico smo pokrito čez noč inkubirali v hladni sobi pri temperaturi 4  $^{\circ}\text{C}$ .

Naslednji dan smo raztopino odlili in začeli s spiranjem. Dodali smo 250  $\mu\text{l}$  pufru PBS + 0,1 % Tween 20 v vsako odprtino, pufer odlili iz ploščice in postopek še enkrat ponovili. Po odstranitvi spiralnega pufru smo dodali 200  $\mu\text{l}$  pufru za blokado (1 % BSA v PBS) na vdolbinico in ploščico eno uro inkubirali pri sobni temperaturi. Ponovno smo odlili pufer za blokado in trikrat spirali z 250  $\mu\text{l}$  PBS + 0,1 % Tween 20. Sledil je nanos 50  $\mu\text{l}$  posameznih serumov, redčenih v 1 % BSA v PBS + 0,1 % Tween, v razmerju 1 : 100. Ploščico smo ponovno eno uro inkubirali pri sobni temperaturi in nato 5-krat spirali z 250  $\mu\text{l}$  PBS + 0,1 % Tween 20. Dodali smo 50  $\mu\text{l}$  sekundarnega protitelesa (z alkalno fosfatazo konjugirana kozja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG, specifična za Fc fragment, Axell), redčenega v 1 % BSA v PBS + 0,1 % Tween 20, v razmerju 1 : 1000 ter eno uro inkubirali pri sobni temperaturi. Ponovno smo ploščo 5-krat spirali z 250  $\mu\text{l}$  PBS + 0,1 % Tween 20 na vdolbinico. Nazadnje smo dodali še 50  $\mu\text{l}$  substrata s koncentracijo 2  $\text{mg/ml}$ ,



ki smo ga pripravili s 5 ml dietanolaminskega pufra (DEA) in dveh tabletk para-nitrofenil-fosfata. Ploščo smo 15–20 min inkubirali v temi, da je začela potekati barvna reakcija. Intenziteto obarvanja – absorbanco (A) smo izmerili s spektrofotometrom Tecan Sunrise pri valovni dolžini 405 nm.

Pri vsaki posamezni analizi smo na določeno mesto na ploščici nanesti le pufer, brez dodanega seruma, kar nam je služilo kot slepi vzorec. Prav tako smo vsakokrat nanesti dva seruma, za katera smo iz predhodnih analiz vedeli, da imata nizek in visok nivo protiteles, ki sta služila kot nizko pozitivna in visoko pozitivna kontrola. Izbrali smo še serum, za katerega smo predhodno vedeli, da daje močno pozitiven rezultat in ga v vsaki analizi nanesti kot standard v serijskih redčitvah 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800 in 1 : 1600 (prikaz redčenja na sliki 2). To nam je omogočilo, da smo meritev A vsakič izvedli v tisti časovni točki, kjer so bile vrednosti standardov najbližje predhodno določenim referenčnim vrednostim za SAA. Reakcija pretvorbe substrata, pri kateri se tvori obarvan produkt, je namreč kontinuiran proces in A skozi čas narašča, dokler ne pride do porabe celotne količine substrata. Tako smo torej omogočili medsebojno primerljivost rezultatov, dobljenih pri različnih analizah, za primerljivost nivojev protiteles pa smo za meritev A pri SAA1 in SAA-HDL vzeli enak časovni interval kakor pri SAA.



Slika 2: Prikaz serijske redčitve standarda

Vsak vzorec seruma, slepi vzorec, visoko in nizko pozitivno kontrolo ter standard smo na ploščico nanesti v dveh paralelah. Rezultatoma obeh paralel smo izračunali povprečno vrednost in koeficient variabilnosti (CV). CV, izračunan po enačbi 3, je moral ustrezati intervalu 0–20 %, v nasprotnem primeru smo analizo ponovili. Povprečnim A vzorcev,

kontrol in standardov smo odšteli povprečno vrednost A slepega vzorca in tako dobili končno A. Izračunali smo tudi korekcijski faktor (Kf) analize za vsako redčitev standarda po enačbi 4 (A reference predstavlja povprečno A posameznega standarda, dobljeno pri petih zaporednih analizah). Povprečna vrednost vseh petih dobljenih Kf standardov je morala ustrezati intervalu 0,8–1,2. S povprečno Kf smo nato pomnožili vse rezultate, da smo dobili korigirano A vzorca (enačba 5).

$$CV = \frac{\text{standarda deviacija}}{\overline{Avzorca}} \quad \text{Enačba 3}$$

$$Kf = \frac{\overline{Areferenca}}{\overline{Astandarda} - \overline{Aslepa}} \quad \text{Enačba 4}$$

$$Akorigirana = \overline{Kf} \times (\overline{Avzorca} - \overline{Aslepa}) \quad \text{Enačba 5}$$

### **3. 9 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata in prenos po Westernu**

Za izvedbo SDS-PAGE, pri kateri smo ločevali in po celotni dolžini nanесли le en protein, smo si morali najprej pripraviti gel. Tega smo s pipeto vliвали med dve stekelci – eno večje in drugo manjše, med sabo ločeni z distančnikom debeline 0,75 mm ter vpeti v nosilec. Predhodno smo stekelca temeljito očistili; najprej z detergentom in destilirano vodo, nato še z etanolom. Ločevalni gel smo pripravili tik pred samo uporabo in ga čim prej s pipeto prenesli med stekelca, da se ne bi začel prehitro strjevati. Vlili smo ga 3 cm pod višino nižjega stekla in na površino dodali manjšo količino destilirane vode, da smo preprečili izsuševanje gela. Počakali smo dobrih 15 minut, da je gel polimeriziral in se strdil. Nato smo pripravili še koncentracijski gel, s filter papirjem popivnali in odstranili plast destilirane vode ter s pipeto med stekelca nalili še približno 2 cm visoko plast koncentracijskega gela. Vanj smo previdno vstavili glavniček, tako da v gel nismo vnesli mehurčkov. Glavniček nam je razdelil prostor v manjši žepek za nanos označevalca velikosti proteinov in večji žepek za nanos vzorca. Ko se je koncentracijski gel strdil, smo si po navodilih pripravili še spodnji in zgornji pufer za elektroforezo. Vzorec proteina za nanos na gel smo pripravili tako, da smo odpipetirali 36,5 µl proteina s koncentracijo 1

mg/ml v epico in dodali še 12,16  $\mu$ l vzorčnega pufra. Epico smo nato za 5 minut postavili v aparat za verižno reakcijo s polimerazo na 98 °C in s tem linearizirali ter denaturirali protein.

Stekelca z gelom smo skupaj z nosilcem premaknili iz nastavka za vlivanje v nastavek za elektroforezo in ga položili v elektroforezno kadičko. Vanjo smo nalili spodnji pufer za elektroforezo, v sredino nastavka s stekelci pa smo nalili zgornji pufer za elektroforezo, ki je segal nad višino nižjega stekelca. Previdno smo odstranili glavniček iz gela in s pomočjo Hamiltonove nanašalne pipete v majhen žepok v gelu nanесли označevalec velikosti proteinov, v večji žepok pa smo enakomerno po celotni dolžini gela nanесли vzorec preiskovanega proteina. Kadičko smo pokrili s pokrovom in jo priklopili na aparat za elektroforezo z električno napetostjo 80 V in tokom 80 mA. Počakali smo, da je protein pripotoval skozi koncentracijski gel in nato napetost zvišali na 125 V. SDS-PAGE smo ustavili, ko je linija potovanja dosegla zadnji centimeter gela.

Po končani SDS-PAGE smo prenesli proteine iz gela na nitrocelulozno membrano z metodo prenosa po Westernu. V blot pufu, ki smo ga pripravili za prenos, smo omočili že pripravljeno izrezano nitrocelulozno membrano, dva filter papirja in dve tanki penasti gobici. Razdrli smo aparat za elektroforezo in odstranili stekelca iz nosilca. S pomočjo distančnika smo stekelci ločili in gelu odstranili zgornji del s koncentracijskim gelom. Preostali ločevalni gel smo previdno prenesli na filter papir, tako da med obema slojema niso nastali mehurčki zraka. Nosilec za prenos smo razprli, na notranjo stran položili gobico in nato filter papir z gelom. Preko gela smo položili nitrocelulozno membrano in še en filter papir. Vse skupaj smo nekoliko obtežili, da smo se znebili morebitnih ujetih mehurčkov med plastmi. Na koncu smo položili še eno gobico in nosilec zaprli. Vstavili smo ga v kadičko za prenos, jo napolnili z blot pufrom, pokrili s pokrovom in priklopili na napetost – pogoji prenosa so bili 100 V in 250 mA za eno uro. Po zaključenem prenosu smo aparaturo razdrli in si na nitrocelulozni membrani označili območje ter stran membrane, ki je bila v stiku z gelom. Membrano smo posušili in razrezali na trakove širine 3 mm. Te smo nato blokiral s pufrom za blokado, inkubirali s serumom, sekundarnim protitelesom in substratom povsem enako kot pri postopku metode DB.

Glede na potovanje obarvanega označevalca molekulske mase proteinov, ki smo ga na membrano prenesli skupaj s preiskovanim proteinom, smo lahko določili pričakovan položaj preiskovanega proteina. V primeru vezave protiteles, usmerjenih proti

preiskovanemu proteinu iz vzorca seruma, smo na pričakovanem položaju prepotovane razdalje proteina dobili obarvan produkt. Vizualno smo ocenili zgolj prisotnost ali odsotnost protiteles proti želenemu proteinu na pričakovanem položaju, pozitivne vzorce pa smo razdelili še v tri skupine glede na intenziteto obarvanja – močno, srednje in rahlo obarvani. Pri tem smo analizirali manjše število naključno izbranih vzorcev iz skupin bolnikov in zdravih krvodajalcev. Enega izmed trakov nitrocelulozne membrane smo inkubirali le s pufrom za blokado in sekundarnim protitelesom, da je služil kot slepi vzorec, s katerim smo izključili morebitno nespecifično vezavo označenega protitelesa.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Pri praktičnem delu magistrske naloge smo najprej določali prisotnost avtoprotiteles proti nekaterim APP (SAA, SAA1, SAA-HDL, CRP, A1AT, A1AG1, albumin in VTNC) z metodo DB. Pri tem smo spreminjali pogoje in razvili ustrezen protokol za določanje prisotnosti avtoprotiteles proti proteinom SAA, SAA1, CRP, A1AG1 in VTNC. Dobljene rezultate smo semikvantitativno ovrednotili z denzitometrijo, podatke pa statistično obdelali in jih primerjali med skupinami bolnikov ter zdravih krvodajalcev.

Z metodo ELISA smo nato kvantitativno določili nivoje avtoprotiteles proti SAA, SAA1 in SAA-HDL. Uporabili smo predhodno postavljen protokol za določitev protiteles proti SAA (22, 41), ki smo ga priredili še za določitev avtoprotiteles proti SAA1 in SAA-HDL.

Nazadnje smo z metodo prenosa po Westernu določali prisotnost avtoprotiteles proti albuminu, A1AT in CRP, tako da smo proteine najprej s SDS-PAGE ločili od morebitnih nečistot in jih z metodo prenosa po Westernu prenesli na membrano. Vizualno smo določili prisotnost avtoprotiteles in intenziteto obarvanih signalov semikvantitativno ovrednotili.

\* V nadaljnjem tekstu smo zaradi boljše razumljivosti besedila uporabili izraze protitelesa proti proteinom akutne faze oz. protitelesa proti posameznemu proteinu ali kar na kratko anti-APP (anti-SAA, anti-CRP, ...), s čimer smo se izognili večkratnemu ponavljanju, da gre pravzaprav za avtoprotitelesa.

### 4.1 Metoda točkovnega prenosa

Pri DB metodi smo naleteli na težavo, saj smo pri nekaterih protitelesih (anti-SAA-HDL, anti-CRP, anti-A1AG1, anti-A1AT in anti-albumin; slika 3) dobili odziv tudi pri slepem vzorcu, kjer smo membrano z nanešenimi proteini inkubirali le v pufru za blokado, brez dodatka seruma. Primarnih protiteles, ki bi se lahko vezala na antigen, torej ni bilo prisotnih, vendar je prišlo do lažno pozitivnega odziva. Sklepamo lahko, da so se sekundarna protitelesa, ki so usmerjena proti Fc regiji protiteles, vezala na antigen na membrani in tako povzročila nespecifično obarvanje slepega

Antigen	Vzorec seruma	Slepi vzorec
SAA-HDL	●	●
CRP	●	●
A1AG1	●	●
A1AT	●	●
Albumin	●	●

Slika 3: Prikaz odzivov pri metodi DB pri vzorcu seruma in slepem vzorcu. Pogoji: koncentracija antigena 0,5 µg/ml, pufer za blokiranje 5-odstotno mleko v TBS in redčitev sekundarnega protitelesa 1 : 1000

vzorca. Pri protitelesih proti CRP in A1AG1 smo lahko vizualno opazili bistveno razliko v intenziteti obarvanja med vzorcem seruma in slepim vzorcem, zato smo pri denzitometričnem vrednotenju vzorcev serumov določili razliko med intenziteto obarvanja med obema vzorcema, ki je predstavljala rezultat specifične vezave protiteles. Kljub temu smo poskusili odpraviti nespecifično vezavo (signal pri slepem vzorcu), ali vsaj dobiti večjo razliko v intenziteti obarvanja med vzorcem seruma in slepim vzorcem s spreminjanjem pogojev analize. Pri protitelesih proti SAA-HDL, A1AT in albuminu pa razlika v intenziteti obarvanja med vzorcem seruma in slepim vzorcem ni bila dovolj velika, zato smo se odločili, da poskusimo protitelesa določiti še z drugimi metodami.

#### *4.1.1 Spreminjanje pogojev analize oziroma protokola*





Pri določanju anti-APP protiteles, pri katerih smo dobili nespecifičen signal pri slepem vzorcu, smo poskusili prilagoditi protokol tako, da bi bila metoda bolj učinkovita pri določanju anti-APP protiteles. Pri tem smo spreminjali naslednje pogoje:

- koncentracijo in/ali zamenjavo pufru za blokado, ki bi lahko vplival na nespecifično vezavo na ozadje membrane,
- koncentracijo nanešenega antigena in
- koncentracijo in/ali zamenjavo sekundarnega protitelesa, ki bi lahko vplivala na intenziteto signalov, posledično pa tudi na absolutno razliko med signalom vzorca in slepega vzorca.

##### *4.1.1.1 Sprememba pufru za blokado*

Glavni namen pufru za blokado je vezava na mesta membrane, kjer ni nanosa antigena in s tem preprečitev vezave ostalim snovem iz seruma, ki bi lahko kasneje ob dodatku sekundarnega protitelesa povzročile nespecifično obarvanje. Membrana, ki s hidrofobnimi interakcijami zagotavlja imobilizacijo nanešenih proteinov, ima visoko vezavno kapaciteto in lahko veže molekule po celotni površini – ravno zaradi tega je blokiranje vezavnih mest membrane zelo pomembno (42). Po navadi se kot pufer za blokado izbere raztopina proteinov (43) – mi smo imeli na voljo BSA in posneto mleko, ki smo ju raztopili v TBS pufru. Prvotne poskuse, pri katerih je prišlo do obarvanja slepega vzorca (slika 3), smo opravljali s 5-odstotnim posnetim mlekom. Menili smo, da bi lahko pri višji koncentraciji mleka prišlo do manj nespecifičnih vezav, vendar je iz slike 4 razvidno, da do sprememb intenzitete signalov pri uporabi 5- ali 7-odstotnega mleka ni prišlo. Pri določanju protiteles

proti A1AT je namreč pri slepem vzorcu, kljub večji koncentraciji mleka za blokiranje, ponovno prišlo do nespecifične vezave sekundarnega protitelesa. Tudi rezultati z uporabo 3- in 5-odstotnega BSA kot pufra za blokado niso prinesli zelenih izidov, saj je bil signal pri slepem vzorcu še vedno prisoten. Ozadje je bilo pri obeh pufrih za blokado pri slepih vzorcih manj intenzivno obarvano kot pri vzorcih s serumom. Sklepamo, da so v tem primeru za intenzivnejše obarvanje ozadja odgovorne molekule iz seruma, ki se kljub blokiranju uspejo adsorbirati na površino membrane in vezati večje število sekundarnih protiteles, kot jih sicer nespecifično vežejo pri vzorcih brez dodatka seruma. Pri pufri za blokado z BSA je obarvanje ozadja pri slepih vzorcih sicer manjše kot pri vzorcih, blokiranih z mlekom, vendar pa je ravno obratno pri vzorcih z dodanim serumom. Intenzivnejše obarvanje ozadja bi pri vzorcih, kjer smo blokirali z BSA in dodali serum, morda lahko razložili z velikostjo proteinov v pufri za blokado. Kazein, ki sestavlja 80 % vseh proteinov v mleku, ima namreč manjšo molekulsko maso od proteina BSA in se iz tega razloga morda lahko veže na membrano v večjem številu ter tako sterično ovira vezavo proteinov iz seruma. Razlika med intenziteto obarvanja področja nanosa proteina in okolice na membrani je večja pri uporabi posnetega mleka kot pufra za blokado, zato smo se v nadaljnjih analizah odločili za uporabo 5-odstotnega posnetega mleka.

Pufer za blokado	SAA, vzorec seruma	SAA, slepi vzorec	A1AT, vzorec seruma	A1AT, slepi vzorec
5-% mleko v TBS				
7-% mleko v TBS				
3-% BSA v TBS				
5-% BSA v TBS				

Slika 4: Spremembe odzivov pri SAA in A1AT v odvisnosti od izbranega pufra za blokado

#### 4.1.1.2 Sprememba koncentracije antigena

Rekombinantne APP smo na membrano najprej nanašali v koncentraciji 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Zaradi signala pri slepem vzorcu smo se odločili poskusiti z nanosom manjše koncentracije antigena na membrano, saj bi nespecifična vezava sekundarnega protitelesa v tem primeru lahko bila manjša. Antigen smo redčili v razmerju 1 : 1 s PBS pufrom, da smo dobili koncentracijo 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in ponovili analizo. Na sliki 5 vidimo, da na rezultate pri protitelesih proti proteinoma SAA in SAA1 redčitev ni imela velikega vpliva, saj pri

slepem vzorcu v nobenem primeru ne pride do obarvanja. Koncentracija antigena prav tako ni imela vpliva na odzive pri protitelesih proti SAA-HDL, saj tukaj ponovno dobimo visok odziv pri slepem vzorcu. Pri vzorcih s protitelesi proti CRP, A1AG1 in A1AT pa je videti, da je intenziteta obarvanja vzorca seruma večja pri nižji koncentraciji antigena, posledično pa je opaznejša tudi razlika med intenziteto obarvanja vzorca seruma in slepega vzorca. Ta rezultat bi morda lahko razložili s prenasičenostjo nanešenega antigena pri koncentraciji 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in zato olajšani vezavi protiteles (oz. sekundarnih protiteles v primeru slepega vzorca) iz seruma pri nižji koncentraciji zaradi lažje dostopnosti in boljše razporeditve epitopov po površini membrane. Tukaj velja še izpostaviti, da ne moremo vedeti, na kakšen način se antigen veže na membrano – vezi so hidrofobne in morda lahko konformacija te vezave določene epitope, pomembne za vezavo protiteles iz seruma, zakrije. Pri vzorcih s protitelesi proti VTNC smo opazili signal pri višji koncentraciji, medtem ko je bil ta pri nižji koncentraciji premalo intenziven. Odločili smo se, da bomo v nadaljnjih analizah antigene SAA, SAA1, CRP in A1AG1 nanesli v koncentraciji 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , VTNC pa v koncentraciji 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Antigena SAA-HDL in A1AT smo izločili iz analize, saj rezultati niso bili obetajoči zaradi premajhne razlike v intenziteti med vzorcem seruma in slepim vzorcem.

Antigen	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , vzorec seruma	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , slepi vzorec	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , vzorec seruma	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , slepi vzorec
SAA	●		●	
SAA1	●		●	
SAA-HDL	●	●	●	●
CRP	●	●	●	●
A1AT	●	●	●	●
A1AG1	●	●	●	●
VTNC	●		●	

Slika 5: Spremembe odzivov dveh različnih koncentracij antigenov pri vzorcu seruma in slepem vzorcu



#### 4.1.1.3 Sprememba (koncentracije) sekundarnega protitelesa

Opredelili smo že, da je najbolj verjeten vzrok visokega odziva pri slepih vzorcih nekaterih antigenov nespecifična vezava sekundarnega protitelesa, ki se v večji meri veže na področje, kjer je nanešen antigen in zgolj v manjši meri na okolico membrane. Tako smo prišli do ideje, da bi morda z manjšo koncentracijo sekundarnega protitelesa lahko zmanjšali odziv pri slepem vzorcu. Poskusili pa smo tudi z uporabo drugega (drugi proizvajalec) encimsko označenega sekundarnega protitelesa, usmerjenega proti Fc regiji človeških protiteles, saj bi morda lahko bil bolj specifičen. Rezultati so predstavljeni na sliki 6. Če pogledamo protitelesa proti SAA1, ni opazne velike razlike – v nobenem primeru ne pride do odziva pri slepem vzorcu, pri vzorcih serumov pa pride do enake intenzitete obarvanja, pri čemer je ozadje nekoliko manj intenzivno obarvano pri uporabi protitelesa proizvajalca BioRad. Podobno lahko vidimo pri protitelesih proti A1AG1 – ozadje je manj obarvano pri protitelesu BioRad. Zanimivo je, da pri vzorcih, ki vsebujejo protitelesa proti A1AG1, pride do opazne razlike med večjo (1 : 2000) in manjšo (1 : 1000) redčitvijo sekundarnega protitelesa proizvajalca BioRad, medtem ko pri protitelesu Axell ta razlika ni prisotna. Za nadaljnje poskuse smo tako izbrali sekundarno protitelo BioRad v redčitvi 1 : 1000, saj ta daje boljše absolutne razlike med intenzitetami obarvanja vzorca seruma, slepega vzorca in ozadja membrane.

Sekundarno protitelo	0,5 µg/µl SAA1, vzorec seruma	0,5 µg/µl SAA1, slepi vzorec	0,5 µg/µl A1AG1, vzorec seruma	0,5 µg/µl A1AG1, slepi vzorec
Axell 1 : 1000				
Axell 1 : 2000				
BioRad 1 : 1000				
BioRad 1 : 2000				

Slika 6: Spremembe odzivov vzorcev seruma in slepih vzorcev pri dodatku dveh različnih sekundarnih protiteles v dveh različnih redčitvah

#### 4. 1. 2 Semikvantitativno ovrednotenje rezultatov

S pomočjo metode DB smo določali prisotnost in semikvantitativno ovrednotili nivoje protiteles proti naslednjim APP: SAA, SAA1, CRP, A1AG1 in VTNC. Dobljene signale smo s pomočjo računalniškega programa spremenili v številčne rezultate (RV; angl. *Raw Volume*), ki so odražali intenziteto obarvanja oz. nivo vezanih protiteles. Na nitrocelulozno membrano smo vedno nanесли enak volumen antigena, vendar po vezavi protiteles in nastanku obarvanega produkta površina signala ni bila vedno enake velikosti. Sklepamo, da je to posledica kapilarnega vleka membrane, viskoznosti raztopine in človeške napake ob aplikaciji s pipeto (volumen in kot nanosa, pritisk ob membrano). Zato smo se odločili, da poskusimo izničiti to napako tako, da površino signala ročno definiramo za vsak posamezen vzorec. Tako je intenziteta obarvanega signala, ki jo program izračuna kot zmnožek površine signala in povprečne vrednosti pikslov, zaradi enakega volumna nanosa in prilagojenega območja odziva še vedno odvisna od količine vezanih sekundarnih protiteles. Če se je torej pri nanosu 1  $\mu$ l antigena kapljica razlila na večjo površino, bomo dobili intenziteto, ki je zmnožek večje površine in nižjega povprečja pikslov, medtem ko bomo v primeru, ko se kapljica adsorbira na membrano na manjši površini, dobili intenziteto kot rezultat manjše površine in višjega povprečja pikslov.

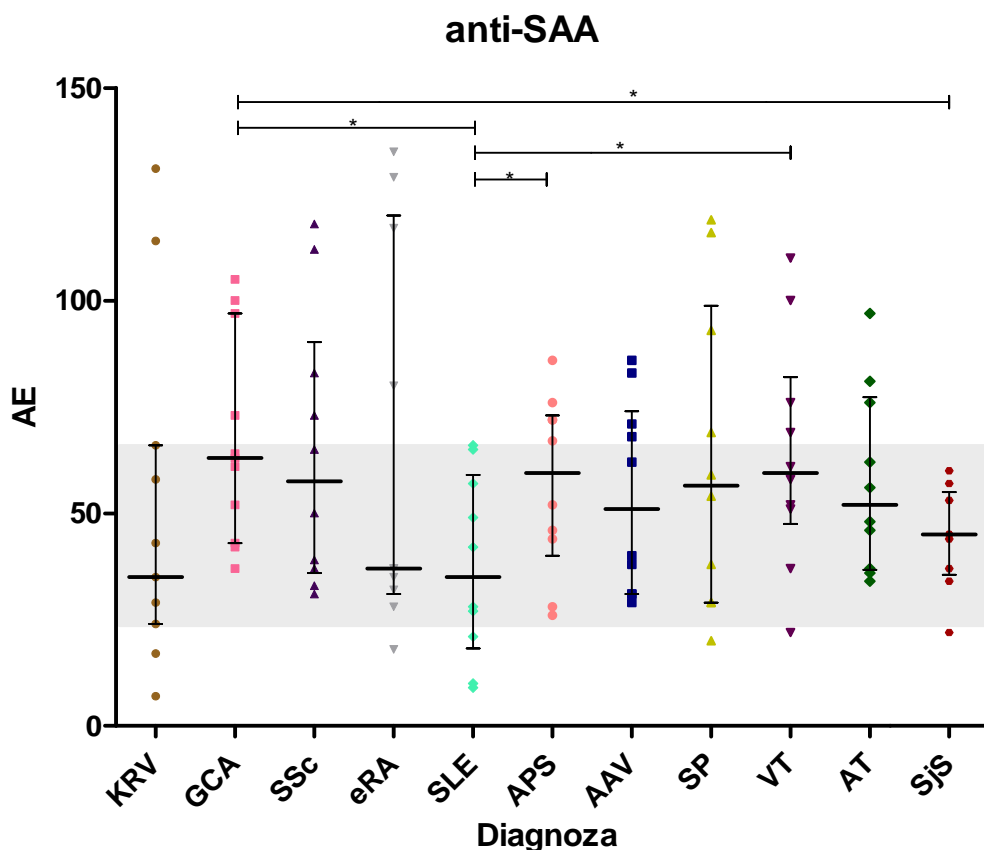
Semikvantitativno smo tako ovrednotili nivoje protiteles v serumih zdravih krvodajalcev, bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi (GCA, SSc, eRA, SLE, APS, AAV, SjS) in srčno-žilnimi boleznimi (SP, VT, AT). Tako zbranim podatkom smo s pomočjo neparametričnih Kruskal Wallisovega in Dunnovega testa za primerjavo rezultatov med več skupinami določili, ali in med katerimi posameznimi skupinami preiskovancev je statistično pomembna razlika ( $p$  vrednost  $< 0,05$ ). Rezultate smo grafično prikazali za vsak posamezen antigen, kjer smo nivoje protiteles po skupinah bolnikov in zdravih krvodajalcev podali v arbitrarnih enotah. Zaradi nenormalne porazdelitve podatkov so na grafih za vsako posamezno skupino prikazane mediane in medkvartilni razpon (IQR) med 25. ter 75. percentilom.

##### 4.1.2.1 Protitelesa proti serumskemu amiloidu A

Mediane in IQR nivojev protiteles anti-SAA so bili med najvišjimi pri bolnikih z GCA (63; 43–97), APS (60; 40–73) in VT (60; 48–82), ki so bili statistično značilno višji od vrednosti pri bolnikih s SLE (35; 18–59) in SjS (45; 36–55) (slika 7). Mediana pri zdravih krvodajalcih (35; 24–66) je bila nižja od median ostalih skupin bolnikov (razen skupine

SLE, ki je imela enako vrednost), vendar se od njih ni statistično pomembno razlikovala. Mediane so pri vseh skupinah bolnikov namreč znotraj IQR določenega pri zdravih krvodajalcih. Metoda DB za določitev protiteles anti-SAA pri izbranih skupinah bolnikov torej ne bi bila primerna za razlikovanje teh bolnikov od zdravih.

Rezultati so nekoliko presenetljivi, saj so predhodne raziskave pokazale, da je koncentracija protiteles proti SAA pri krvodajalcih višja v primerjavi z bolniki s sistemskimi avtoimunskimi in nekaterimi srčno-žilnimi boleznimi (22, 33). Glede na naše rezultate lahko sklepamo, da je pri bolnikih z vnetnimi boleznimi (GCA, APS, SSc) povečana potreba po odstranitvi APP med (kroničnim) vnetjem in je posledično povečana tudi produkcija protiteles, če drži, da je njihova funkcija odstranjevanje (spremenjenega oz. nefunkcionalnega) proteina. Najnižje povprečje izmerjenih vrednosti protiteles anti-SAA je pri skupini bolnikov s SLE, kar se kaže tudi z največ statistično pomembnimi razlikami glede na skupine APS, VT in GCA.

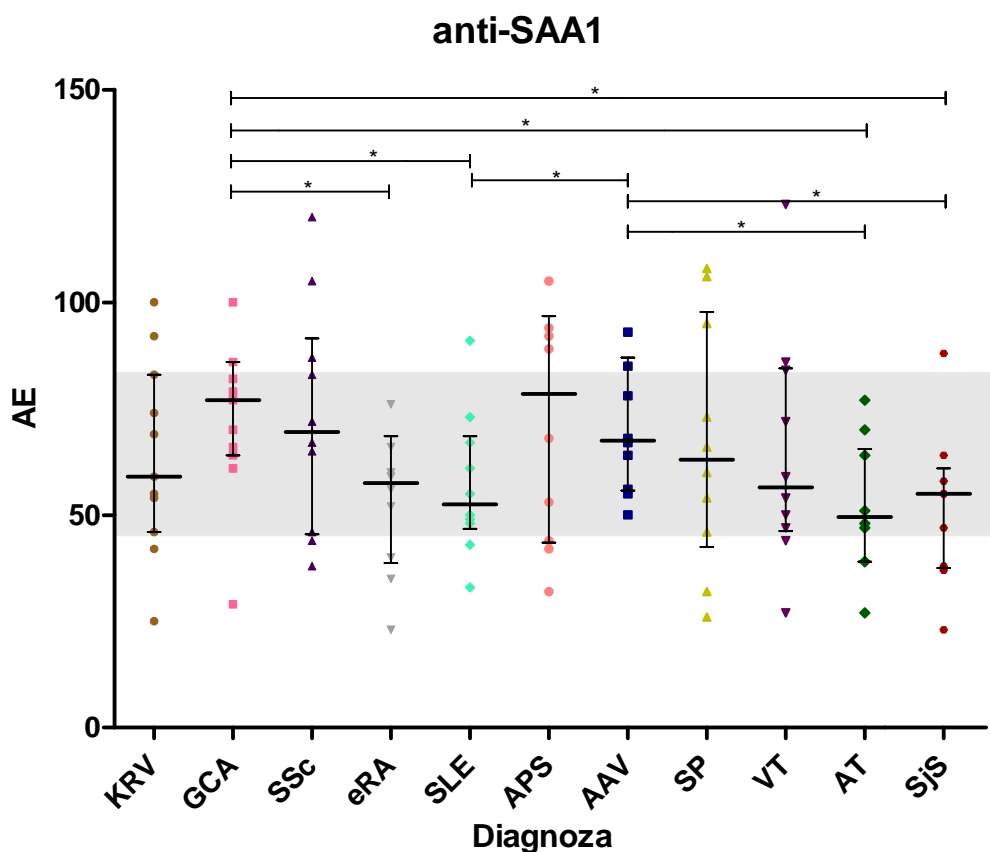


Slika 7: Nivoji protiteles anti-SAA, določeni z DB metodo, v serumih bolnikov in zdravih krvodajalcev ter prikaz statistično pomembnih razlik med njimi. Horizontalne črte prikazujejo mediano, vertikalne pa območje medkvartilnega razpona med 25. in 75. percentilom; sivo območje označuje medkvartilni razpon zdravih krvodajalcev; \* pa prikazuje statistično pomembno razliko, kjer je  $p < 0,05$

Zanimivo je, da je ena izmed višjih izmerjenih vrednosti pripadala vzorcu iz skupine zdravih krvodajalcev, kar je tudi nekoliko vplivalo na povprečje skupine. Na vse izmerjene vrednosti bi namreč lahko vplivali tudi aktivnost primarne bolezni, morebitne pridružene bolezni, jemanje določenih zdravil, stres in ostali dejavniki okolja, ki pa jih pri naši raziskavi nismo upoštevali. Za določevanje protiteles proti SAA smo na membrano vezali rekombinantno pridobljen SAA, ki je hibrid med oblikama SAA1 in SAA2 ter v takšni obliki ne obstaja *in vivo*. Posledično ima lahko drugačno terciarno obliko od serumske in zaradi tega bi lahko bile drugačne tudi vrednosti vezanih protiteles anti-SAA. Če je namreč prišlo do prostorske spremembe njihovega vezavnega mesta na proteinu, se aktivno mesto protiteles konformacijsko ne bo prilagajalo epitopu in vezava ne bo potekla (19).

#### *4.1.2.2 Protitelesa proti serumskemu amiloidu A1*

Med nivoji protiteles proti SAA1 (slika 8) je bilo presenetljivo več statističnih razlik med skupinami bolnikov v primerjavi s protitelesi proti SAA, vendar se tudi tukaj mediane bolnikov v primerjavi z zdravimi krvodajalci niso statistično pomembno razlikovale. Mediane nivojev protiteles anti-SAA1 so pri vseh skupinah bolnikov ponovno znotraj IQR, določenega pri skupini zdravih krvodajalcev. Podobno kot pri anti-SAA, so bile mediane in IQR vrednosti anti-SAA1 najvišje pri skupinah bolnikov z APS (79; 44–97), GCA (77; 64–86) in SSc (70; 46–92), najnižje pa pri AT (50; 39–66), SLE (53; 47–69) in SjS (55; 38–41). Veliko statistično pomembnih razlik je s skupino AAV (68; 56–87), ki ima 4. najvišjo mediano, vendar so rezultati vseh vzorcev serumov iz te skupine zelo enakomerno porazdeljeni. Ker je SAA1 zgolj ena od oblik v družini SAA proteinov, smo pričakovali, da bodo povprečne vrednosti na grafu podobno razporejene kot pri rezultatih za anti-SAA (slika 7). Lahko bi rekli, da večinska podobnost res obstaja, vendar pa so izjeme skupine bolnikov s srčno-žilnimi boleznimi (SP, VT, AT). Pri teh bolnikih so vrednosti anti-SAA1 protiteles opazno nižje od vrednosti anti-SAA. Sklepamo lahko, da imajo prisoten višji delež protiteles proti obliki SAA2, kar lahko pomeni, da je večja potreba po odstranitvi tega proteina. Trenutno še ni na voljo komercialno dostopne rekombinantne oblike SAA2, vendar bi bilo v prihodnosti zanimivo določiti tudi protitelesa proti tej obliki, saj bi na podlagi teh podatkov lahko ugotovili, katera oblika je bolj pomembna pri zdravih ali določenih skupinah bolnikov.

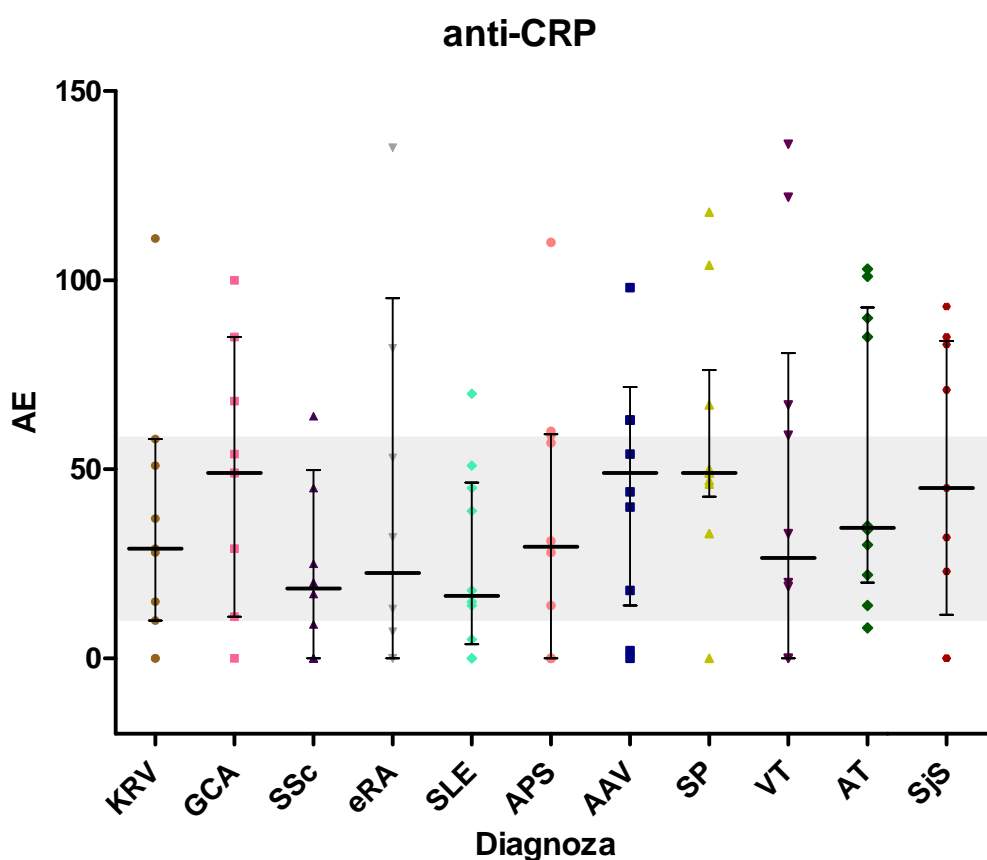


Slika 8: Nivoji protiteles anti-SAA1, določeni z DB metodo, v serumih bolnikov in zdravih krvodajalcev ter prikaz statistično pomembnih razlik med njimi. Horizontalne črte prikazujejo mediano, vertikalne pa območje medkvartilnega razpona med 25. in 75. percentil

#### 4.1.2.3 Protitelesa proti C-reaktivnemu proteinu

Mediane in IQR protiteles anti-CRP se med skupinami bolnikov in zdravih krvodajalcev niso statistično značilno razlikovale (slika 9). Ponovno so mediane protiteles anti-CRP pri vseh skupinah bolnikov znotraj IQR vrednosti zdravih krvodajalcev. Nekoliko višje vrednosti lahko opazimo pri skupinah bolnikov z GCA (49; 11–85), AAV (49; 14–72) in SP (49; 43–76), nižje pa pri bolnikih s SLE (17; 4–47), SSc (19; 0–50) ter eRA (23; 0–95). Zanimivo je, da smo, podobno kot že prej pri anti-SAA in anti-SAA1, opazili višje vrednosti pri skupini bolnikov z GCA, nižje pa pri skupini bolnikov s SLE. Glede na to, da oba proteina spadata med glavne APP in se njuni plazemski koncentraciji med APR podobno zvišujeta in znižujeta, bi lahko rekli, da so tudi nivoji protiteles proti obema proteinoma podobno razporejeni pri skupinah bolnikov. Vendar pa po drugi strani v predhodnih študijah niso ugotovili nobene povezave med koncentracijami SAA in anti-SAA (22, 41) ter med CRP in anti-CRP (18, 41). Vseeno smo pričakovali, da bomo pri bolnikih s SLE določili višje nivoje protiteles anti-CRP v primerjavi z zdravimi

krvodajalci, kot so to pokazali že Sjowall in sodelavci z uporabo metode ELISA. Prav tako so ugotovili tudi povezavo med nivoji protiteles anti-CRP in aktivnostjo SLE (18). V drugi študiji pa je Bell s sodelavci ugotovil, da se protein ob vezavi na plastično podlago pri metodi ELISA konformacijsko spremeni in tako izpostavi nove epitope za vezavo anti-CRP protiteles (44). Morda bi lahko bila vezava proteina na nitrocelulozno membrano drugačna in posledično tudi rezultati niso povsem primerljivi z ostalimi metodami. Pri skupini bolnikov z eRA, pri katerih so v različnih študijah ugotovljene povišane plazemske koncentracije CRP (8, 12), smo zaznali nižje vrednosti anti-CRP protiteles.

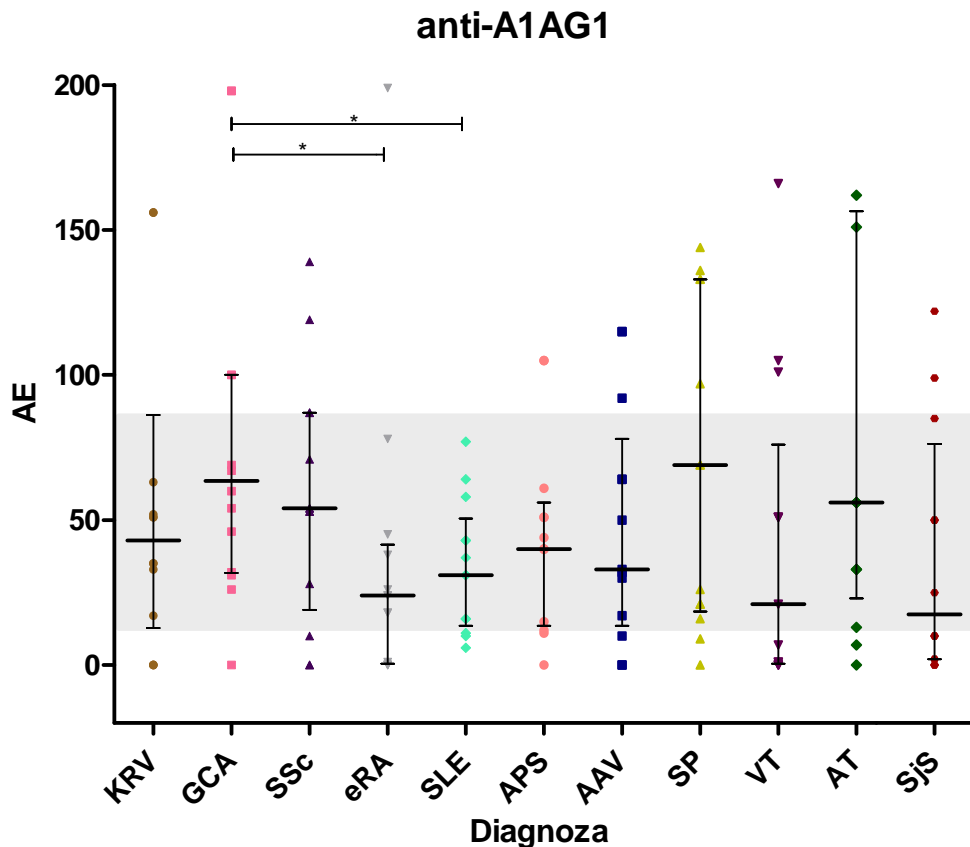


Slika 9: Nivoji protiteles anti-CRP, določeni z DB metodo, v serumih bolnikov in zdravih krvodajalcev ter prikaz statistično pomembnih razlik med njimi. Horizontalne črte prikazujejo mediano, vertikalne pa območje medkvartilnega razpona med 25. in 75. percentil

#### 4.1.2.4 Protitelesa proti alfa 1-kislemu glikoproteinu

Ponovno lahko opazimo, da so nivoji (mediana, IQR) protiteles proti A1AG1 pri skupini bolnikov z GCA (64; 32–100) med najvišjimi, med nižjimi pa pri skupini bolnikov s SLE (31; 14–51) in eRA (24; 1–42) (slika 10). Med navedenimi skupinami so razlike tudi statistično pomembne. Mediane nivojev protiteles anti-A1AG1 so pri vseh skupinah bolnikov znotraj IQR vrednosti zdravih krvodajalcev. Zanimivo je, da so plazemske

koncentracije proteina A1AG1 značilno povišane pri bolnikih s SLE in eRA (10), vrednosti nivojev protiteles, pridobljenih z DB analizo, pa so pri teh dveh skupinah povprečno nižje od krvodajalcev, kar sovpada z idejo, da je ena izmed funkcij anti-APP odstranjevanje APP. Podobno potem velja tudi pri skupini bolnikov z VT, saj so koncentracije A1AG1 običajno povišane pri aterosklerozi (10), količine prisotnih anti-A1AG1 protiteles v serumih pa so nizke. Izjemi sta skupini bolnikov z AT in SP, kjer so izmerjene vrednosti anti-APP nekoliko višje. Tukaj bi bile lahko razlog za višje povprečje izstopajoče visoke vrednosti pri dveh bolnikih, ki morda niso značilne za osnovno bolezen in so morebiten vpliv dejavnikov, ki jih pri analizi nismo upoštevali. Z večjim številom vključenih vzorcev bi se takim vplivom lahko izognili.

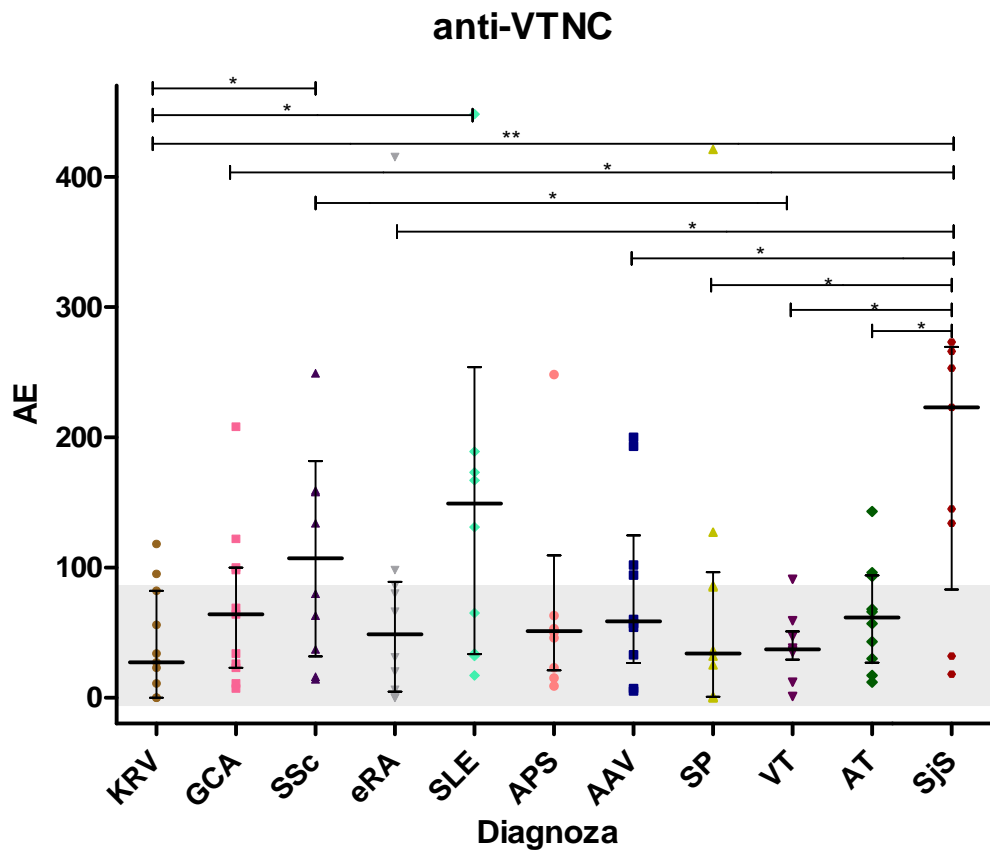


Slika 10: Nivoji protiteles anti-A1AG1, določeni z DB metodo, v serumih bolnikov in zdravih krvodajalcev ter prikaz statistično pomembnih razlik med njimi. Horizontalne črte prikazujejo mediano, vertikalne pa območje medkvartilnega razpona med 25. in 75. percentilom; sivo območje označuje medkvartilni razpon zdravih krvodajalcev; \* pa prikazuje statistično pomembno razliko, kjer je  $p < 0,05$

#### 4.1.2.5 Protitelesa proti vitronektinu

Pri določanju nivojev protiteles proti APP z metodo DB smo pri anti-VTNC dobili največ statistično pomembnih razlik med skupinami bolnikov, kot tudi med skupinami bolnikov in zdravimi krvodajalci (slika 11). Zanimivo je, da so bile intenzitete signalov tukaj nižje kot pri ostalih anti-APP protitelesih, kar pomeni, da je protiteles proti VTNC v serumih manj, kot jih je proti glavnim APP. Najvišje vrednosti (mediana, IQR) ima skupina bolnikov s SjS (223; 83–270), ki se zato tudi v največji meri razlikuje glede na ostale skupine bolnikov. Pri skupinah bolnikov s SSc (107; 32–182) in SLE (149; 34–254) smo prav tako določili visoke povprečne vrednosti, vse tri omenjene skupine bolnikov (SjS, SSc in SLE) pa izstopajo tudi po tem, da so njihove mediane izven IQR, določenega pri zdravih krvodajalcih. Za razliko od rezultatov, pridobljenih za nivoje protiteles proti glavnima APP in A1AG1, pa je pri rezultatih za anti-VTNC skupina bolnikov s SLE tokrat imela visoke vrednosti avtoprotiteles. Zanimivo bi bilo pogledati, kakšne so plazemske koncentracije VTNC pri teh bolnikih. Znano je, da je koncentracija VTNC višja pri bolnikih s srčno-žilnimi boleznimi (30), nivoji protiteles anti-VTNC pa so pri skupinah bolnikov s SP, VT in AT višje od povprečnih vrednosti pri zdravih krvodajalcih. Mediana zdravih krvodajalcev je namreč najnižja za anti-VTNC rezultate, pridobljene z DB metodo. Zanimivo bi bilo določiti plazemske koncentracije VTNC pri posameznih skupinah bolnikov in preveriti, če pride pri tem proteinu do povezave med vrednostma antigena in avtoprotitelesa oz. ali so vrednosti zvišane med aktivacijo ali razrešitvijo bolezni, saj bi takrat lahko bolje sklepali o njihovi vlogi.





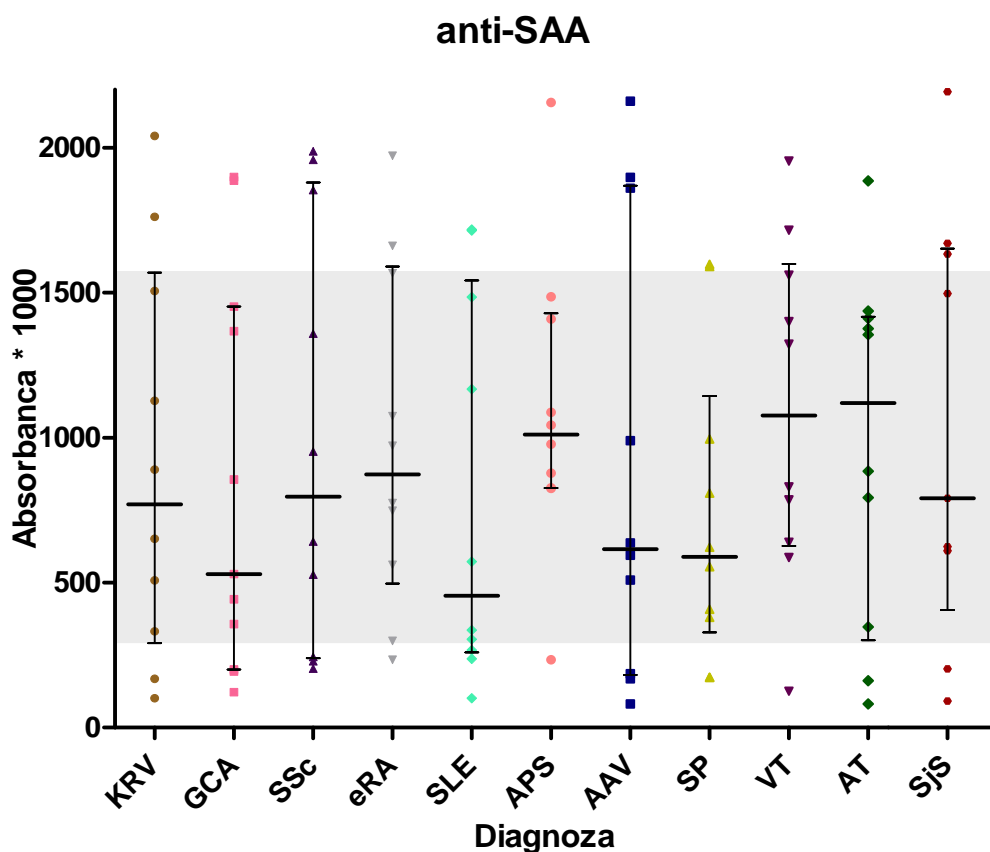
Slika 11: Nivoji protiteles anti-VTNC, določeni z DB metodo, v serumih bolnikov in zdravih krvodajalcev ter prikaz statistično pomembnih razlik med njimi. Horizontalne črte prikazujejo mediano, vertikalne pa območje medkvartilnega razpona med 25. in 75. percentilom; sivo območje označuje medkvartilni razpon zdravih krvodajalcev; \* pa prikazuje statistično pomembno razliko, kjer je  $p < 0,05$  ter \*\*  $p < 0,01$

## 4. 2 Encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu

Z metodo ELISA smo kvantitativno določali količino protiteles proti proteinom SAA, SAA1 in SAA-HDL. Uporabili smo vzorce serumov enakih skupin bolnikov in zdravih krvodajalcev kot predhodno pri metodi DB.

### 4. 2. 1 Protitelesa proti serumskemu amiloidu A

Rezultati porazdelitve izmerjenih A pri določanju protiteles anti-SAA v posameznih serumih bolnikov in zdravih krvodajalcev so prikazani na sliki 12. Statistična analiza podatkov ni pokazala nobene statistično pomembne razlike med skupinami, kar se razlikuje glede na podatke, pridobljene za ista protitelesa z metodo DB. Med sliko 7 in sliko 12 so opazne izrazite razlike v količini protiteles predvsem med skupinami bolnikov z GCA, AAV in SP. Z metodo DB smo najvišje povprečje vrednosti izmerili pri skupini bolnikov z GCA, ki so bile tudi višje od povprečja zdravih krvodajalcev, kar pa ne velja za rezultate, izmerjene z metodo ELISA. Tukaj sta namreč mediana in IQR nivojev protiteles proti SAA pri skupini bolnikov z GCA (530; 122–1452) nižja kot pri zdravih krvodajalcih (771; 101–1570). Podobne razlike med metodama lahko opazimo tudi pri skupini bolnikov z AAV. Zanimivo je, da so dobljene vrednosti pri obeh skupinah bolj homogeno razporejene pri semi-kvantitativni metodi DB. Opazimo lahko tudi, da je z metodo ELISA izmerjena mediana količine protiteles proti SAA pri zdravih krvodajalcih višja v primerjavi s skupinami bolnikov z GCA, SLE (455; 260–1542), AAV (616; 182–1870) in SP (589; 329–1144). Takšen rezultat bi lahko podprl teorijo o varovalni funkciji protiteles anti-SAA, saj bi nižje vrednosti pri bolnikih lahko nakazovale na pomanjkanje varovalnih funkcij in neravnovesje vnetnega procesa. Vseeno pa mediane pri vseh skupinah bolnikov padejo znotraj IQR porazdelitve rezultatov pri zdravih krvodajalcih, kar pomeni, da metoda ne bi bila uporabna kot pomoč pri diagnozi posameznih bolezni. V objavljeni študiji so Rosenau in sodelavci povišane nivoje anti-SAA povezali predvsem s srčno-žilnimi boleznimi, kar se sklada z našimi pridobljenimi rezultati za skupini bolnikov z VT in AT, izjema pa je skupina bolnikov s SP (41). Do podobnih dognanj za bolnike z VT so prišli tudi Lakota in sodelavci, medtem ko so pri skupini bolnikov z AT zaznali nižje vrednosti anti-SAA kot pri krvodajalcih. V naši študiji smo določili nižje vrednosti anti-SAA pri bolnikih s SLE v primerjavi z zdravimi krvodajalci, kar se ujema z ugotovitvami Lakote in sodelavcev (22). Ponovno pa gre tukaj izpostaviti vprašanje glede vpliva rekombinantnega hibrida, ki bi morda lahko vplival na pridobljene rezultate.

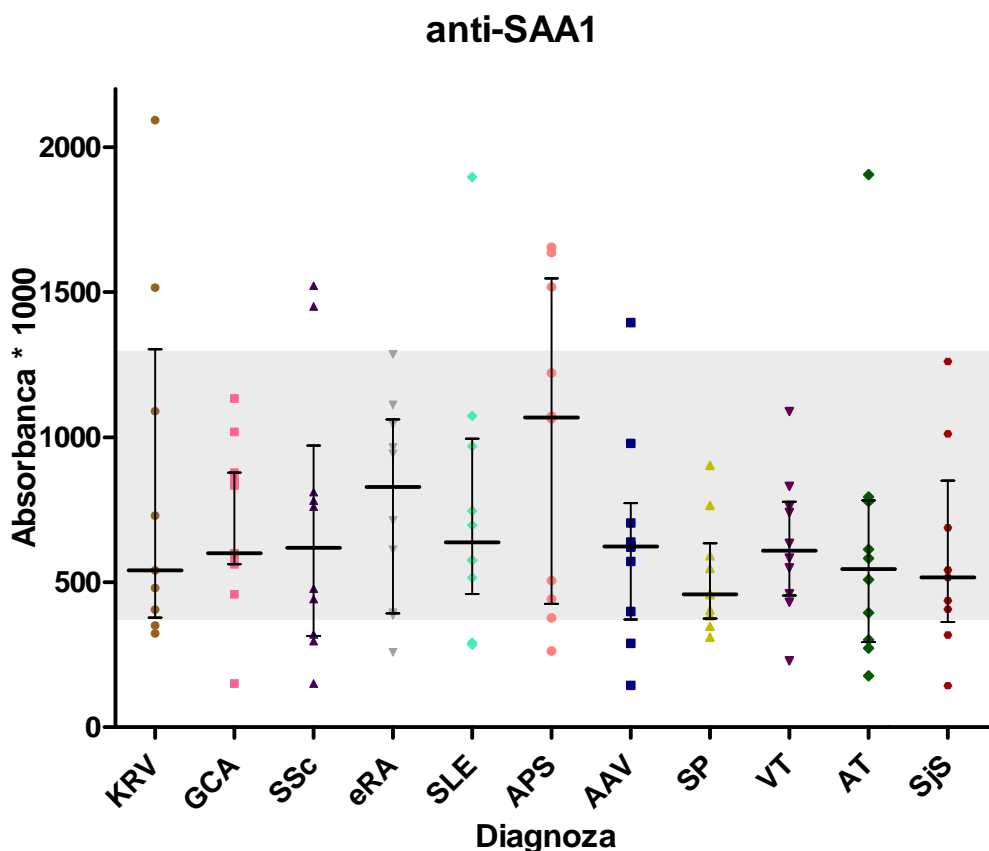


Slika 12: Nivoji protiteles anti-SAA, določeni z metodo ELISA, v serumih bolnikov in zdravih krvodajalcev. Horizontalne črte prikazujejo mediano, vertikalne pa območje medkvartilnega razpona med 25. in 75. percentilom; sivo območje označuje medkvartilni razpon zdravih krvodajalcev

#### 4. 2. 2 Protitelesa proti serumskemu amiloidu A1

Rezultati za protitelesa proti SAA1 pri posameznih skupinah bolnikov in zdravih krvodajalcev so prikazani na sliki 13. Tudi tukaj med skupinami ni statistično pomembnih razlik; mediane skupin bolnikov spet v celoti padejo v IQR, določen pri zdravih krvodajalcih. Za razliko od rezultatov pri anti-SAA so pri anti-SAA1 vse mediane skupin bolnikov višje od mediane krvodajalcev, izjema sta le skupini bolnikov s Sjs in SP. Morebitno varovalno funkcijo protiteles proti SAA1 bi lahko razložili s tem, da povišane vrednosti nakazujejo poskus povečanega odstranjevanja APP. Porazdelitev median po posameznih skupinah bolnikov je pri protitelesih anti-SAA1 v veliki meri podobna kot pri anti-SAA, kar je podoben rezultat, kot smo ga dobili pri metodi DB, le da so tam izstopale skupine bolnikov s srčno-žilnimi boleznimi (SP, AT, VT), ki so imele opazno nižje nivoje protiteles anti-SAA1. V skladu s pričakovanji smo določili nižje vrednosti anti-SAA1 protiteles v primerjavi z anti-SAA. Izjema je skupina bolnikov s SLE, pri katerih so bile vrednosti anti-SAA1 v primerjavi z anti-SAA višje. Razlog je sicer neznan; mogoče je pri

teh bolnikih med APR bolj pomembna oblika SAA1 in protitelesa proti SAA2 tvorijo le v manjši meri. Kljub temu bi bilo v prihodnosti smiselno določiti še protitelesa proti SAA2. Zanimivo bi bilo tudi izmeriti koncentracije tako SAA1 kot SAA2 v serumih teh bolnikov med APR. Različni rezultati pri obeh protitelesih kažejo na antigensko specifičnost serumskih anti-APP, ki so prisotni tudi pri zdravih krvodajalcih in morda res lahko imajo različne vnetne funkcije.

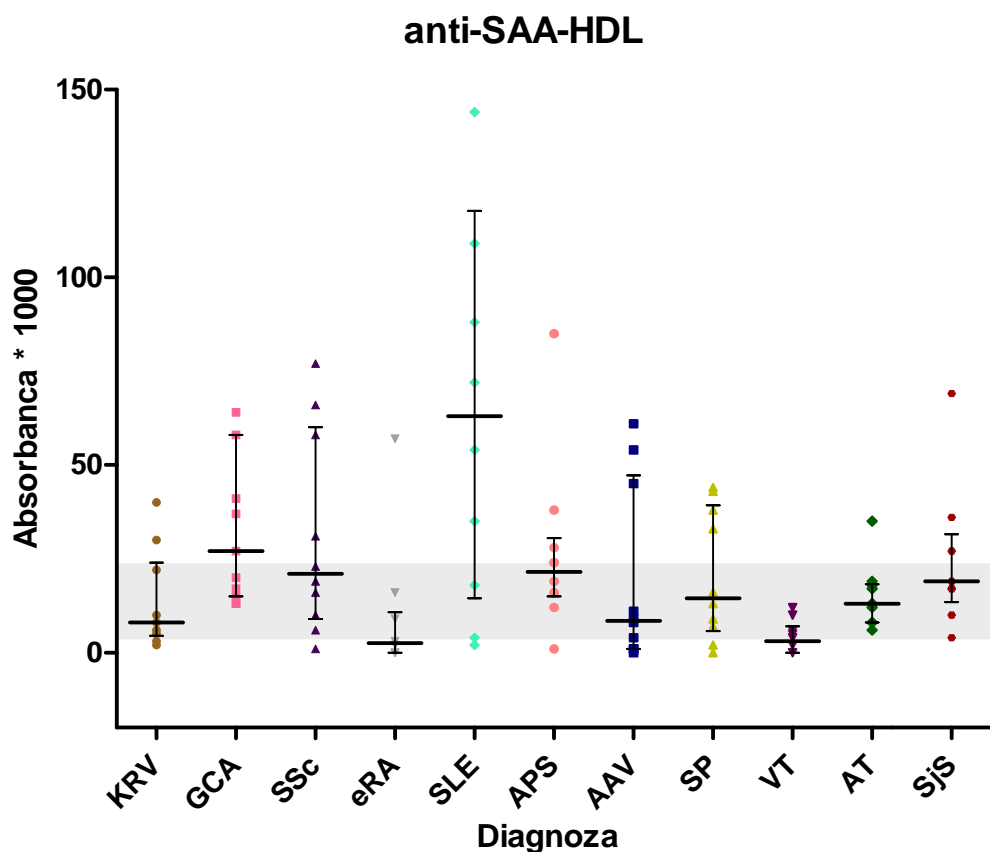


Slika 13: Nivoji protiteles anti-SAA1, določeni z metodo ELISA, v serumih bolnikov in zdravih krvodajalcev. Horizontalne črte prikazujejo mediano, vertikalne pa območje medkvartilnega razpona med 25. in 75. percentilom; sivo območje označuje medkvartilni razpon zdravih krvodajalcev

Pri določanju protiteles anti-SAA1 z metodo DB smo najvišje vrednosti dobili pri skupini bolnikov z GCA in AAV, medtem ko smo z metodo ELISA pri omenjenih skupinah določili zgolj rahlo višje vrednosti od skupine krvodajalcev, kar ponovno kaže na opazno razliko med semikvantitativno in kvantitativno metodo. Z metodo ELISA smo namreč določili visoke vrednosti pri skupini bolnikov z eRA, kjer pa smo z metodo DB določili nižje povprečne vrednosti v primerjavi s skupino zdravih.

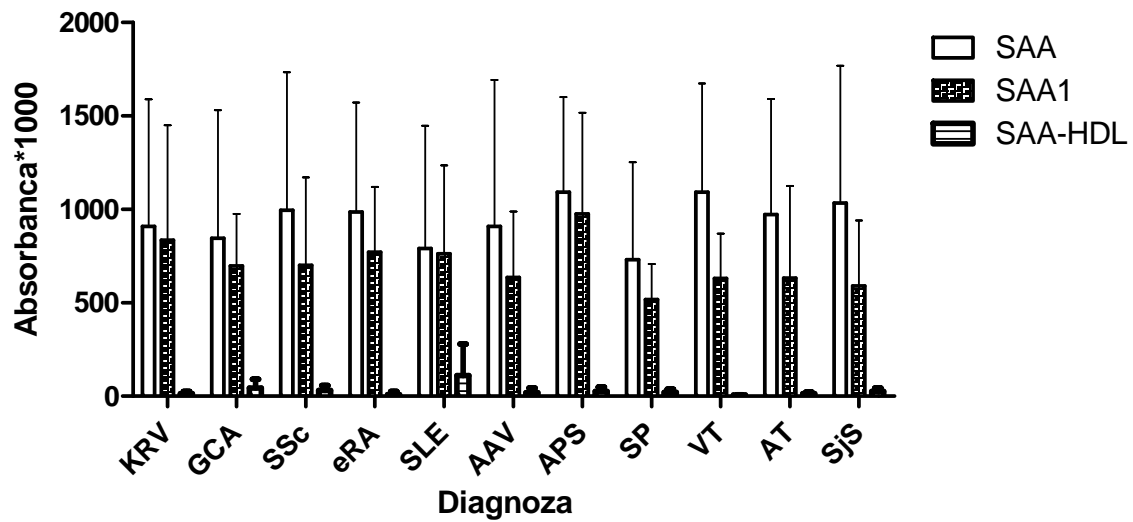
#### *4. 2. 3 Protitelesa proti serumskemu amiloidu A, vezanem na lipoprotein visoke gostote*

Znano je, da ima SAA vpliv na metabolizem maščob, vendar sam mehanizem še ni natančno razložen. Pri povišanih koncentracijah med APR se SAA lahko vrine na mesto apolipoproteina-A1 in ga nadomesti v molekuli HDL (20). V plazmi naj bi bil SAA v veliki večini vezan na HDL (ocenjujejo se vrednosti nekje med 25 in 50 % vseh HDL molekul (10)), zato smo se odločili, da bomo kot antigen na ELISA ploščo vezali tudi SAA-HDL in pogledali, ali se protitelesa anti-SAA vežejo nanj v isti meri kot na sam protein SAA. Pri določanju protiteles anti-SAA-HDL je pri metodi DB prišlo do nespecifične vezave med sekundarnim protitelesom in antigenom, ki je tudi s postopkom spreminjanja pogojev nismo uspeli izničiti. Pri metodi ELISA pa do nespecifične vezave ni prišlo, vendar so bile vrednosti pri vseh vzorcih zelo nizke. Razlog bi lahko bila manjša prisotnost protiteles, specifičnih za SAA-HDL oz. zgolj HDL molekulo, ali pa so se protitelesa anti-SAA vezala na SAA-HDL v manjšem obsegu kakor na antigen SAA. Glede na pridobljene višje nivoje protiteles anti-SAA lahko sklepamo, da se ta vežejo na epitope, ki so na tistem delu molekule SAA, kjer je tudi vezavno mesto za HDL, ki torej zakrije epitope za vezavo avtoprotiteles. Izstopajoče najvišje izmerjene vrednosti smo določili pri skupini bolnikov s SLE, kar bi morda lahko kazalo na prisotnost protiteles, specifičnih za SAA-HDL ali HDL. Pri skupinah bolnikov s srčno-žilnimi boleznimi pa so vrednosti nižje in lahko kažejo na manjšo mero odstranjevanja molekule SAA-HDL iz telesa, kar bi glede na patogenezo bolezni lahko tudi pričakovali. Molekula HDL, vezana na SAA, ima namreč v primerjavi s prosto molekulo nižjo sposobnost sprejetja holesterola s strani lipoproteinov nižje gostote in posledično tudi slabšo varovalno funkcijo pred nastankom ateroskleroze (23). Pri skupinah bolnikov z GCA (m 27, IQR 15–58), eRA (m 3, IQR 0–11), SLE (m 63, IQR 15–118) in VT (m 3, IQR 0–7) so mediane izven medkvartilnega razpona, določenega pri skupini zdravih krvodajalcev (m 8, IQR 5–24). Kot pomanjkljivost pa velja izpostaviti, da so bile vrednosti A pri vseh skupinah zelo nizke, tudi do 20-krat nižje od izmerjenih A pri protitelesih anti-SAA. Pri tako nizkih vrednostih so morebitni okoliški faktorji in tudi človeška napaka toliko bolj opazni. Metoda ELISA tako ni najbolj primerna za kvantifikacijo nivojev protiteles proti SAA-HDL v serumih, saj je premalo občutljiva. Lahko bi sicer poskusili optimizirati metodo z menjavo ploščice za ELISA (površinsko prevlečene bi morda konformacijsko drugače vezale nanešen antigen) in bi zato dobili višje vrednosti A.



Slika 14: Nivoji protiteles anti-SAA-HDL, določeni z metodo ELISA, v serumih bolnikov in zdravih krvodajalcev. Horizontalne črte prikazujejo mediano, vertikalne pa območje medkvartilnega razpona med 25. in 75. percentilom; sivo območje označuje medkvartilni razpon zdravih krvodajalcev

Povprečne vrednosti protiteles anti-SAA in anti-SAA1, pridobljenih z metodo ELISA, so zelo podobne pri vseh skupinah bolnikov in zdravih; med njimi namreč ni statistično pomembnih razlik. Nivoji protiteles anti-SAA1 so nižji od protiteles anti-SAA, kar smo tudi pričakovali, najnižje pa so vrednosti protiteles anti-SAA-HDL. Protitelesa so torej prisotna pri vseh v poskus vključenih bolnikih z vnetnimi boleznimi in tudi pri zdravih krvodajalcih, kvantitativne razlike pa niso zadostne za identifikacijo oz. razlikovanje med posameznimi boleznimi.



Slika 15: Zbrani rezultati intenzitet odzivov pri antigenih SAA, SAA1 in SAA-HDL za posamezne skupine serumov bolnikov ter zdravih krvodajalcev, merjenih po preteku enakega časa z metodo ELISA

### 4. 3 Prenos po Westernu

S prenosom po Westernu smo potrdili rezultate, pridobljene z metodo DB za določanje protiteles proti CRP, ter preverili prisotnost protiteles proti albuminu in A1AT, za katera metoda DB ni bila ustrezna. Proteine (albumin, A1AT in CRP) smo ločili s pomočjo SDS-PAGE in se s tem znebili morebitnih nečistot, nastalih med njihovo sintezo, ter jih prenesli na nitrocelulozno membrano. Pri proteinu CRP smo s to metodo uspeli določiti tudi multimerizacijo proteina in presoditi, ali se protitelesa vežejo na multimerno obliko ali na posamezne podenote. Prisotnost protiteles proti nekaterim APP smo določali kvalitativno in jih vizualno ovrednotili glede na intenziteto obarvanega signala.

#### 4. 3. 1 Protitelesa proti albuminu

Albumin je protein velikosti 66 kDa, kar pomeni, da se po prenosu po Westernu nahaja na membrani med območjema označevalca molekulske mase 45 in 76 kDa. Na sliki 16 je pričakovano področje albumina označeno z rdeče obrobljenim trakom, vendar pa do obarvanega signala ni prišlo pri nobeni skupini bolnikov ali zdravih, prav tako pa ne pride do nespecifičnega obarvanja pri slepem vzorcu. Možno je, da smo se z SDS-PAGE uspeli znebiti nečistote, ki je bila odgovorna za obarvanje slepega vzorca pri metodi DB, vendar je ta očitno bila razlog obarvanja tudi pri ostalih vzorcih serumov. Lahko gre za nečistote v obliki proteinskih ostankov, nastalih med sintezo rekombinantnega proteina. Manjši delci so pri SDS-PAGE potovali do spodnjega roba gela in so odgovorni za obarvanje membrane na spodnjem koncu, vidno pa je tudi obarvanje membrane v zgornjem delu, pri katerem gre za večje – najverjetneje sprijete – skupke proteina. Drug možen razlog za odsotnost odzivov pa je lahko tudi v konformaciji proteina, saj je po SDS-PAGE ta v linearni obliki, pri DB pa v nativni obliki. Če so torej avtoprotitelesa usmerjena proti strukturnemu epitopu, se na lineariziran protein ne morejo vezati. Pri metodi DB pa bi za odziv lahko bila odgovorna navzkrižno-reaktivna protitelesa, primarno usmerjena proti drugemu epitopsko podobnemu antigenu. V izbranih serumih iz posameznih skupin bolnikov in zdravih krvodajalcev torej ni zaznati protiteles, usmerjenih proti linearnemu albuminu, kar lahko razložimo z dejstvom, da albumin sodi med znižane APP. Tem se plazemska koncentracija med vnetnim procesom zmanjša in tako med fazo razrešitve vnetja prehajajo nazaj na bazalno raven s povečano sintezo. Pri teh pogojih torej ni povečane potrebe po odstranjevanju proteinov, kakor je pri zvišanih APP. Nekatere raziskave sicer navajajo zaznana protitelesa proti albuminu, vendar domnevajo, da so ta



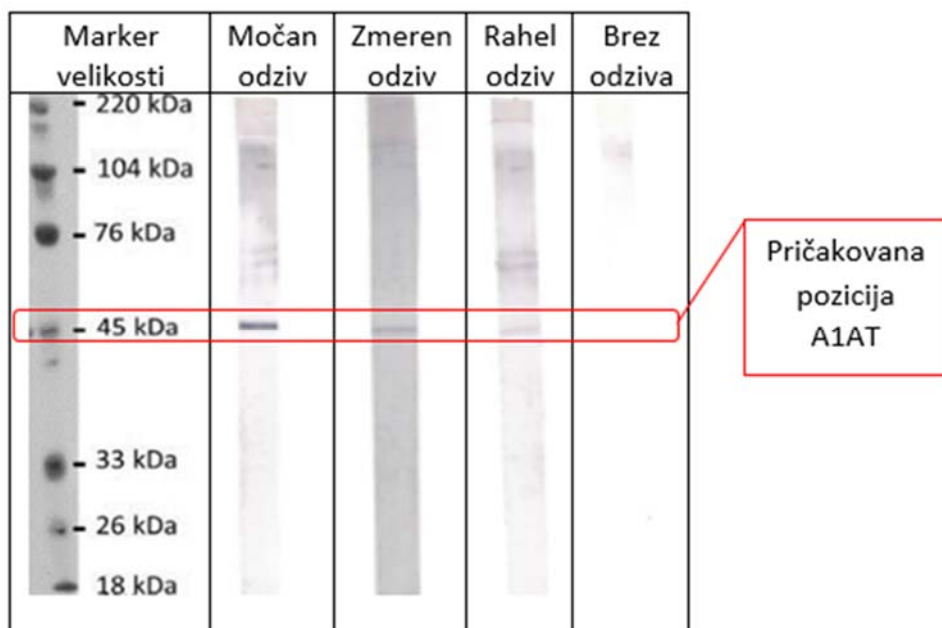
usmerjena proti spremenjeni oz. glikozilirani obliki (33). V našem poizkusu je bila uporabljena nativna oblika proteina, kar bi torej lahko kazalo na to, da protitelesa, usmerjena proti albuminu, razlikujejo med nativno in spremenjeno obliko. Za potrditev te predpostavke bi v prihodnje lahko izvedli podobno analizo, le da bi nanegli albumin, izoliran iz serumov bolnikov, ki se v tem nahaja v obeh oblikah – tako spremenjeni (glikozilirani) kot nativni.



Slika 16: Protitelesa proti albuminu, določena z metodo prenosa po Westernu

#### 4. 3. 2 Protitelesa proti alfa 1-antitripsinu

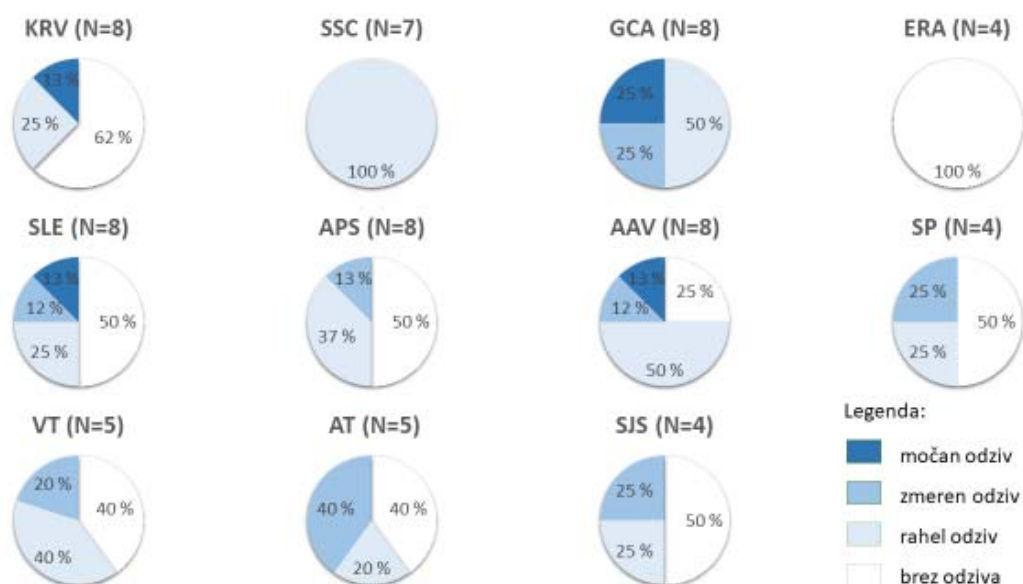
Pričakovani položaj proteina A1AT po ločitvi s SDS-PAGE in prenosu po Westernu je prikazan na 45 kDa (slika 17). Pri slepem vzorcu (na sliki 17 pod oznako brez odziva) v območju pričakovanega položaja proteina ne dobimo obarvanega signala, kar pomeni, da smo uspeli ločiti protein od nečistot, odgovornih za obarvanje slepega vzorca pri metodi DB. Na zgornjem delu membrane je pri slepem vzorcu razvidno obarvanje, ki je posledica vezave sekundarnih protiteles in za katerega sklepamo, da so odgovorne nečistote iz vzorca antigena, ki pa so večje molekulske mase od proteina A1AT, zato gre najverjetneje za skupke proteinov, nastale med njegovo sintezo. Kvalitativno smo določali prisotnost ali odsotnost protiteles proti A1AT in na podlagi intenzitete obarvanja signala pri velikosti 46 kDa preiskovance razdelili v štiri kategorije: preiskovanci z odsotnostjo protiteles (brez odziva), preiskovanci z rahlim, zmernim in z močnim odzivom (slika 17).



Slika 17: Prikaz kategorij odzivov pri prenosu po Westernu za antigen A1AT

Analizirali smo 69 vzorcev serumov bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi: GCA (n = 8), SLE (n = 8), APS (n = 8), AAV (n = 8), SSc (n = 7), eRA (n = 4) in SjS (n = 4); srčno-žilnimi boleznimi: VT (n = 5), AT (n = 5) in SP (n = 4), ter vzorcev zdravih krvodajalcev (n = 8). Na sliki 18 je razvidna tudi porazdelitev rezultatov glede na intenziteto obarvanih signalov. Znižane plazemske koncentracije A1AT povezujejo z višjim tveganjem za razvoj RA in SLE (11), zato je zanimivo videti, da so protitelesa proti A1AT odsotna pri celotni skupini bolnikov z eRA in kar pri polovici bolnikov s SLE. Iz teh rezultatov lahko torej sklepamo, da vezava protiteles ni odgovorna za nižje koncentracije proteina A1AT, ki bi lahko bile posledica njegove odstranitve s strani protiteles. Kar 62 % zdravih krvodajalcev v serumih nima prisotnih protiteles proti A1AT, iz česar lahko sklepamo, da le-ta niso naravno prisotna, njihova funkcija pa torej ni nujno zaščitna. V nekaterih raziskavah sicer navajajo prisotnost protiteles proti karbamilirani obliki proteina pri bolnikih z RA in tudi pri zdravih krvodajalcih (25). Obstaja možnost, da se pojavijo kasneje v poteku bolezni in jih pri naših vzorcih z eRA ne opazimo, ali pa avtoprotitelesa razlikujejo med obema oblikama. Možno je tudi, da je 38 % pozitivnih vzorcev v skupini krvodajalcev vsebovalo protitelesa proti modificirani (torej karbamilirani) obliki A1AT, vendar ne moremo biti povsem prepričani, ali se ta vežejo zgolj na nativni ali tudi na rekombinantni protein. Podobno kot pri albuminu bi torej tudi pri A1AT lahko ponovili poskus s proteinom, izoliranim iz serumov bolnikov, in nato

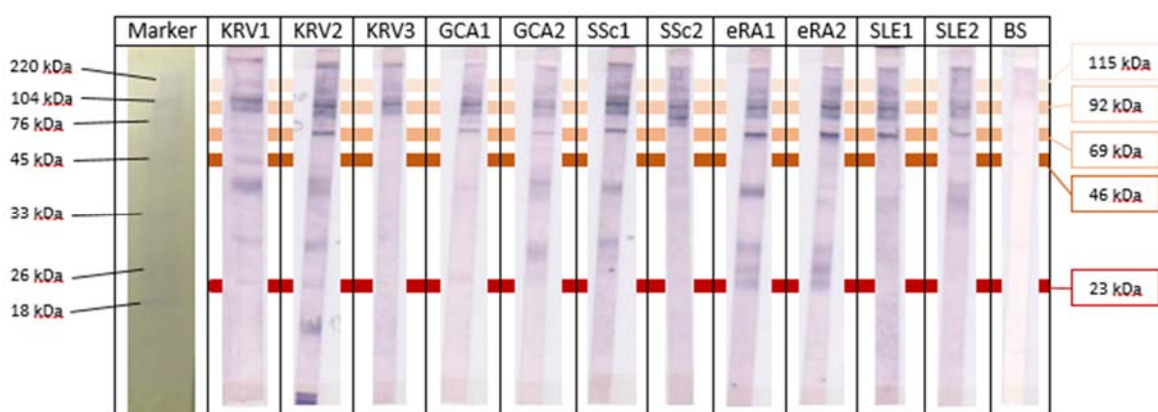
primerjali rezultate, vendar bi za boljšo analizo podatkov potrebovali tudi informacije o deležu native in modificirane oblike v serumu posameznika ter podatek o tem, ali se protitelesa specifično vežejo zgolj na eno obliko. Pri analizi, kjer bi nanесли enaki koncentraciji in volumna (izoliranega ali rekombinantnega) karbamiliranega proteina kot smo sedaj, bi morali dobiti enak odziv kot pri nanosu native oblike proteina, vendar zgolj v primeru, da protitelesa ne razlikujejo med obema oblikama. Rezultati pri bolnikih s SSc (100 % pozitivni) in eRA (100 % negativni) so z metodo prenosa po Westernu povsem homogeni, zato bi bilo zanimivo videti enak poskus na večjem obsegu vzorcev. Morebitno analizo, ki bi omogočala kvantitativno določitev anti-A1AT vrednosti, pa bi morda lahko uporabljali tudi kot pomoč pri diagnozi bolnikov s SSc in eRA. Žal pa, glede na 62 % delež preiskovancev brez prisotnosti protiteles pri krvodajalcih, najverjetneje ne bi mogli razlikovati med zdravimi in skupinami bolnikov s SLE, APS, SP, VT, AT in Sjs, katerih delež prisotnosti protiteles je med 40 in 50 %. Le pri bolnikih z GCA in SSc so bila protitelesa prisotna v vseh vzorcih, pri skupini bolnikov z GCA tudi v največjem deležu z močnim odzivom, kar pomeni, da so protitelesa v višji koncentraciji. Ta bi lahko prispevala k patogenezi bolezni, če sklepamo, da protitelesa odstranjujejo native obliko proteina, ki ima pri vnetju varovalno vlogo, ter da so morda ravno ta protitelesa zaradi zmanjšane možnosti razrešitve odgovorna za dolgotrajnejšo vnetje.



Slika 18: Prikaz semikvantitativne porazdelitve protiteles proti A1AT po posameznih skupinah bolnikov in krvodajalcev

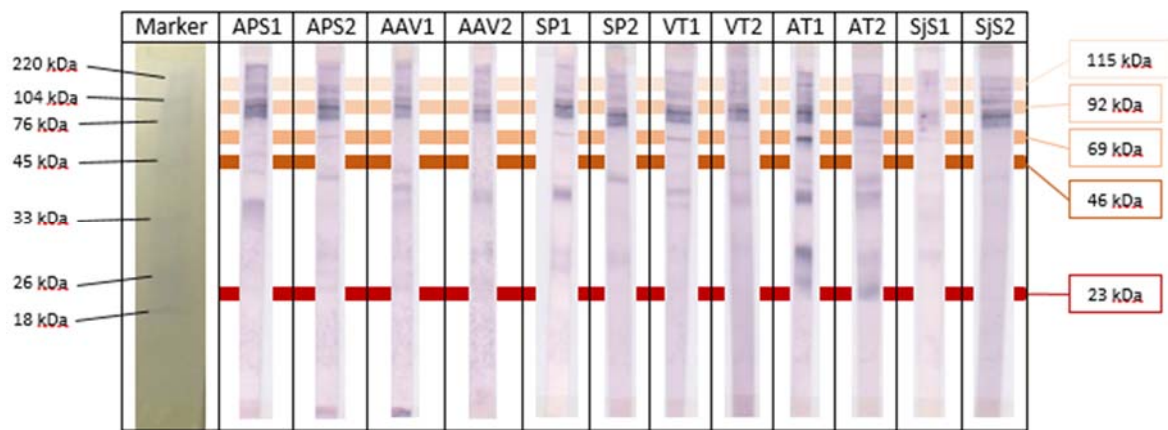
### 4. 3. 3 Protitelesa proti C-reaktivnemu proteinu

Z metodo prenosa po Westernu smo določali protitelesa anti-CRP v 23. vzorcih serumov – naključno smo izbrali 3 vzorce iz skupine zdravih krvodajalcev in 2 vzorca iz posameznih skupin serumov bolnikov. Na slikah 19 in 20 so prikazani vsi pridobljeni rezultati. Obarvan signal smo sicer pričakovali zgolj na delu membrane, na položaju pri 23 kDa, kar ustreza velikosti rekombinantnega CRP, vendar smo obarvane signale dobili na petih različnih mestih – nativni CRP je namreč sestavljen iz petih identičnih podenot, ki so med sabo nekovalentno povezane. Sklepamo lahko, da je tudi v raztopini rekombinantnega proteina prišlo do nekovalentnega povezovanja med posameznimi enotami ter tako do štirih različnih multimerov, ki se nahajajo na membrani na področju velikosti 46, 69, 92 in 115 kDa. Žal iz pridobljenih rezultatov ne moremo natančno povedati, ali gre za en tip protiteles, usmerjenih proti antigenu CRP, ali več tipov protiteles, specifičnih za multimerne oblike. Podenote ob nekovalentnem povezovanju namreč lahko sterično prekrijejo epitope, ali pa zaradi interakcij spremenijo terciarno in kvartarno obliko ter posledično tudi vezavno mesto za protitelesa. Protitelesa anti-CRP naj bi se vezala tudi na spremenjeno monomerno obliko CRP (16), vendar signal pri velikosti 23 kDa ni prisoten pri vseh vzorcih, je pa prisoten pri obeh bolnikih iz skupine eRA, ki ima značilno povišane plazemske koncentracije CRP (8). Sklepali bi lahko, da zaradi višjih koncentracij proteina pride do večje pretvorbe v lokalno vnetno aktivno obliko mCRP in posledično večjo količino protiteles, ki jih poskušajo odstraniti, vendar so ta prisotna tudi pri enem od treh vzorcev krvodajalcev.



Slika 19: Prikaz rezultatov za protitelesa proti CRP po ločitvi s poliakrilamidno elektroforezo in prenosu po Westernu; 1. del

Zanimivo je, da pri skupinah bolnikov s SLE in SjS, ki nimata tako značilno povišanih plazemskih koncentracij CRP kot ostale avtoimunske bolezni z vnetno komponento (npr. eRA, GCA) (12), ni prisotnih protiteles proti monomerni obliki. Protitelesa proti dimerni obliki so bila pri vseh skupinah prisotna le v manjši meri, kar je lahko posledica nestabilnosti in torej manjše prisotnosti dimera v raztopini rekombinantnega proteina, ali pa protitelesa proti tej obliki niso prisotna. Protitelesa proti trimerni obliki so prisotna v večji meri tako pri skupinah bolnikov z GCA in eRA kot pri skupini bolnikov s SLE. Opazni so še odzivi, ki so prisotni pri enem od dveh vzorcev v skupini bolnikov s SSc, APS, SP, AT in VT ter pri enem od treh vzorcev zdravih krvodajalcev. V teh primerih bi veljalo razširiti analizo na večje število vzorcev, da bi dobili natančnejše podatke o pojavnosti odzivov.



Slika 20: Prikaz rezultatov za protitelesa proti CRP po ločitvi s poliakrilamidno elektroforezo in prenosu po Westernu; 2. del

Protitelesa proti tetra- in pentamerni obliki so prisotna pri vseh vzorcih, vendar zaradi obarvanosti slepega vzorca na področju pentamerne oblike ne moremo biti prepričani, ali gre za odziv zaradi vezave protiteles ali nespecifično vezavo sekundarnih protiteles na nečistote, nastale ob sintezi proteina. Zanimivo bi bilo ponoviti poizkus s plazemskim izoliranim antigenom – morda bi tako dobili signal zgolj pri pentamerni obliki, saj naj bi se plazemski CRP nahajal pretežno v tej obliki, monomeri pa naj bi nastajali lokalno in v večji meri naj ne bi bili prisotni v serumu (18). V tem primeru bi nas zanimalo tudi, ali bi enoten signal imel intenziteto enako vsoti pridobljenih intenzitet pri rekombinantem proteinu, ali bi bile nižje – posledično bi to nakazovalo na specifičnost serumskih protiteles zgolj proti eni ali posameznim enotam.

## 5 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo s pomočjo encimsko-imunskih metod kvalitativno oz. kvantitativno določili prisotnost in nivoje protiteles proti nekaterim APP (SAA, SAA1, SAA-HDL, CRP, VTNC, A1AG1, A1AT in albumin) v serumih bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi (AAV, APS, eRA, GCA, SjS, SLE in SSc) in srčno-žilnimi boleznimi (SP, VT in AT) ter zdravih krvodajalcev.

Najprej smo uporabili metodo DB. Pri tem smo poskusili spreminjati pogoje in protokol tako, da je bila metoda uporabna za določanje protiteles proti SAA, SAA1, CRP, VTNC in A1AG1. Kot pufer za blokado smo izbrali 5-odstotno mleko; optimalna koncentracija za nanos večine proteinov je bila 0,5 µg/µl, razen za vitronektin (1 µg/µl). Pri izbranem encimsko označenem sekundarnem protitelesu (proizvajalca BioRad) smo se odločili za redčitev 1 : 1000. Pri določevanju protiteles proti CRP in A1AG1 smo kljub poskusu spremembe postopka še vedno dobivali signal pri slepem vzorcu, ki pa je bil opazno manjše intenzitete kakor pri vzorcih seruma, zato smo spremenili postopek izračuna intenzitete obarvanja in rezultat nespecifičnega obarvanja pri slepem vzorcu odšteli od rezultatov, dobljenih pri vzorcih. Mediane nivojev protiteles proti SAA, SAA1, CRP in A1AG1 so bile pri vseh skupinah bolnikov znotraj IQR, določenega pri zdravih krvodajalcih. Rezultati za anti-SAA kažejo, da je količina protiteles pri skupini zdravih krvodajalcev nižja od skupin bolnikov, kar morda nakazuje na povečano potrebo po odstranitvi SAA iz obtoka in posledično tudi povečano produkcijo protiteles. Pri skupini bolnikov z GCA smo določili najvišji povprečni vrednosti protiteles proti SAA in SAA1, medtem ko so bile najnižje pri skupini bolnikov s SLE. Pri količinah protiteles proti VTNC so izstopale predvsem skupine bolnikov s SjS, SSc in SLE, pri katerih so bile povprečne vrednosti visoke in izven IQR, določenega pri zdravih krvodajalcih. Povprečna vrednost protiteles proti A1AG1 je bila nižja pri skupinah bolnikov s SLE in eRA. Metoda DB bi bila torej najbolj uporabna za semikvantitativno določevanje protiteles proti SAA, SAA1 in VTNC.

Hišna metoda ELISA je že bila postavljena za določanje protiteles proti SAA, uporabili pa smo jo tudi za določitev protiteles proti SAA1 in SAA-HDL. Rezultati, pridobljeni s to metodo, so nam dali kvantitativne podatke o količini prisotnih protiteles. Sicer pri protitelesih proti SAA in SAA1 med skupinami bolnikov in zdravimi krvodajalci nismo opazili statistično pomembnih razlik, so pa bile vrednosti anti-SAA v splošnem višje od

anti-SAA1, kar smo tudi pričakovali. Najvišje mediane nivojev protiteles proti proteinu SAA so bile pri skupini bolnikov z AT, proti SAA1 pa pri skupini bolnikov z APS. Povprečne vrednosti nivojev protiteles tako proti SAA kot tudi proti SAA1 so bile pri vseh skupinah bolnikov znotraj IQR, določenega pri zdravih krvodajalcih. Pri rezultatih za protitelesa anti-SAA-HDL so bile dobljene vrednosti zelo nizke v primerjavi s protitelesi proti SAA in SAA1. Razlog za nizke odzive bi lahko bila nizka prisotnost protiteles ali prekrivanje epitopov SAA s strani vezane molekule HDL ter posledično nezmožnost vezave anti-SAA protiteles.

Za določevanje protiteles proti albuminu in A1AT metoda DB ni bila ustrezna, zato smo se odločili, da bomo omenjena proteina najprej ločili s pomočjo SDS-PAGE in nato protitelesa določili s pomočjo prenosa po Westernu. Prav tako smo se odločili, da bomo s pomočjo elektroforeznega ločevanja potrdili prisotnost protiteles proti CRP. S SDS-PAGE smo uspešno ločili nečistote od analiziranih antigenov in se tako znebili odzivov pri slepih vzorcih, dobili pa smo tudi podatek o multimerizaciji proteina CRP. Ugotovili smo, da protitelesa proti albuminu niso prisotna pri nobeni skupini bolnikov kakor tudi ne pri zdravih krvodajalcih. Protitelesa proti A1AT so bila prisotna pri vseh bolnikih s SSc in GCA (pri bolnikih z AAV, VT in AT pa v več kot 50 % primerov), odsotna pa pri vseh bolnikih z eRA (pri bolnikih s SjS, SP, APS, SLE ter pri KRV pa v več kot 50 % primerov). Za samo statistično analizo bi morali analizirati večje število vzorcev, prav tako bi bilo v prihodnosti potrebno proučiti, kakšna je vloga teh protiteles. Z razvojem kvantitativne metode (npr. ELISA) bi v prihodnje lahko določali koncentracijo protiteles anti-A1AT in določili, pri katerih skupinah bolnikov so le-te povišane/znižane v primerjavi z zdravimi krvodajalci, kar bi nam lahko služilo tudi kot pomoč pri diagnozi bolezni. Pri prenosu CRP na membrano smo ugotovili, da pride do vezave protiteles tako na monomerno kot tudi na multimerne oblike proteina. Protitelesa proti monomerni obliki CRP so najbolj izrazita pri skupini eRA, medtem ko so protitelesa proti multimernim oblikam prisotna tako pri skupinah bolnikov kot tudi pri zdravih krvodajalcih.

Ugotovili smo, da so protitelesa proti večini izbranih APP (razen proti albuminu in A1AT) v večini primerov prisotna tako pri zdravih krvodajalcih kot tudi pri vseh skupinah bolnikov. Zato bi bilo v prihodnosti potrebno razviti metode, ki bi nam kvantitativno določile nivoje posameznih protiteles. Zanimivo bi bilo razviti metodo hkratnega določevanja večjega števila analitov, ki je sicer že razvita za določevanje protiteles proti

določenim citokinom, kjer bi na magnetne delce vezali večje število APP in hkrati določali protitelesa, usmerjena proti njim, v serumih različnih bolnikov z avtoimunskimi boleznimi in serumih zdravih krvodajalcev. Na ta način bi lahko dobili odtis repertoarja protiteles, ki so bolj ali manj pomembna pri določenih boleznih.



## 6 LITERATURA

1. Ribarič S, et al.: Temelji patološke fiziologije, 2. izdaja, UL, MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011: 163–182.
2. Helbert M: Immunology for Medical Students E-Book, Elsevier Health Sciences, 2016.
3. Jurca J: Osnove imunologije, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, 2003.
4. Parham P: The immune system, Garland Science, 2014.
5. Meyers R A: Immunology, Wiley-Vch, 2007.
6. Gabay C, Kushner I: Acute-phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *New England Journal of Medicine*, 1999; 340: 448–454.
7. Janciauskiene S, Welte T, Mahadeva R: Acute Phase Proteins: Structure and Function Relationship. V: *Acute Phase Proteins-Regulation and Functions of Acute Phase Proteins*, InTech, 2011.
8. Lakota K, Frank M, Buzan O, Tomsic M, Rozman B, Sodin-Semrl S: Acute Phase Proteins in Prototype Rheumatic Inflammatory Diseases. V: *Acute Phase Proteins-Regulation and Functions of Acute Phase Proteins*, InTech, 2011.
9. Samols D, Agrawal A, Kushner I: Acute Phase Proteins. *Cytokine Reference on-Line*, 2002.
10. Schultz D R, Arnold P I: Properties of Four Acute Phase Proteins: C-reactive Protein, Serum Amyloid A Protein, Alpha-1-acid Glycoprotein, and Fibrinogen. V: *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 20, 1990: 129–147.
11. Janciauskiene S, Wrenger S, Welte T: Immunoregulatory Properties of Acute Phase Proteins – Specific Focus on Alpha-1-Antitrypsin. V: *Acute Phase Proteins*, InTech, 2013.
12. Ablj H C, Meinders A E: C-reactive Protein: History and Revival. *European Journal of Internal Medicine*, 2002; 13: 412–422.
13. Volanakis J E: Human C-reactive Protein: Expression, Structure, and Function. *Molecular Immunology*, 2001; 38: 189–197.
14. Eisenhardt S U, Habersberger J, Peter K: Monomeric C-reactive Protein Generation on Activated Platelets: the Missing Link Between Inflammation and Atherothrombotic Risk. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2009; 19: 232–237.
15. Eisenhardt S U, Habersberger J, Murphy A, Chen Y-C, Woollard K J, Bassler N, et al.: Dissociation of Pentameric to Monomeric C-reactive Protein on Activated Platelets Localizes Inflammation to Atherosclerotic Plaques. *Circulation Research*, 2009; 105:

128–137.

16. Wu Y, Potempa L A, El Kebir D, Filep J G: C-reactive Protein and Inflammation: Conformational Changes Affect Function. *Biological Chemistry*, 2015; 396: 1181–1197.
17. Eisenhardt S U, Thiele J R, Bannasch H, Stark G B, Peter K: C-reactive Protein: How Conformational Changes Influence Inflammatory Properties. *Cell Cycle*, 2009; 8: 3885–3892.
18. Sjöwall C, Wetterö J: Pathogenic Implications for Autoantibodies Against C-reactive Protein and Other Acute Phase Proteins. *Clinica Chimica Acta*, 2007; 378: 13–23.
19. De Buck M, Gouwy M, Ming Wang J, Van Snick J, Opdenakker G, Struyf S, et al.: Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-dependent Functions During Host Insults. *Current Medicinal Chemistry*, 2016; 23: 1725–1755.
20. Sun L, Richard D Y: Serum amyloid A1: Structure, Function and Gene Polymorphism. *Gene*, 2016; 583: 48–57.
21. [Http://www.uniprot.org/uniprot/?query=serum+amyloid+a&sort=score](http://www.uniprot.org/uniprot/?query=serum+amyloid+a&sort=score).
22. Lakota K, Thallinger G G, Cucnik S, Bozic B, Mrak-Poljsak K, Ambrozic A, et al.: Could Antibodies Against Serum Amyloid A Function as Physiological Regulators in Humans? *Autoimmunity*, 2011; 44: 149–158.
23. Lakota K, Mrak-Poljsak K, Rozman B, Sodin-Semrl S: Serum Amyloid A and its Potential Physiological/pathological Functions-an Overview of Patents. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, 2010; 4: 89–99.
24. López-Árias E, Aguilar-Lemarroy A, Felipe Jave-Suárez L, Morgan-Villela G, Mariscal-Ramirez I, Martinez-Velázquez M, et al.: Alpha 1-antitrypsin: A Novel Tumor-associated Antigen Identified in Patients with Early-stage Breast Cancer. *Electrophoresis*, 2012; 33: 2130–2137.
25. Verheul M K, Yee A, Seaman A, Janssen G M, van Veelen P A, Drijfhout J W, et al.: Identification of Carbamylated Alpha 1 anti-trypsin (A1AT) as an Antigenic Target of anti-CarP Antibodies in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 2017; 80: 77–84.
26. Hochepped T, Berger FG, Baumann H, Libert C: Alpha-1-Acid Glycoprotein: an Acute Phase Protein with Inflammatory and Immunomodulating Properties. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2003; 14: 25–34.
27. Aslan S, Ikitimur B, Cakmak H, Karadag B, Tufekcioglu E, Ekmekci H, et al.: Prognostic Utility of Serum Vitronectin Levels in Acute Myocardial Infarction. *Herz*, 2015; 40: 685–689.

28. Preissner K T, Seiffert D: Role of Vitronectin and its Receptors in Haemostasis and Vascular Remodeling. *Thrombosis Research*, 1998; 89: 1–21.
29. Nogita T, Kawashima M: Increased Levels of Plasma Vitronectin in Severe Psoriatic Patients. *Archives of Dermatological Research*, 1992; 284: 315–317.
30. Ekmekci H, Sonmez H, Ekmekci O B, Ozturk Z, Domanic N, Kokoglu E: Plasma Vitronectin Levels in Patients with Coronary Atherosclerosis are Increased and Correlate with Extent of Disease. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2002; 14: 221–225.
31. Neelofar K, Ahmad J: An Overview of in vitro and in vivo Glycation of Albumin: a Potential Disease Marker in Diabetes Mellitus. *Glycoconjugate Journal*, 2017; 34: 575–584.
32. Vozelj M, Kotnik V, Lunder J: *Temelji imunologije*, DZS, 2000.
33. Lakota K, Zigon P, Mrak-Poljsak K, Rozman B, Shoenfeld Y, Sodin-Semrl S: Antibodies Against Acute Phase Proteins and their Functions in the Pathogenesis of Disease: a Collective Profile of 25 Different Antibodies. *Autoimmunity Reviews*, 2011; 10: 779–789.
34. Amital H, Shoenfeld Y: *Natural Autoantibodies, Herald, Protecting and Inducing Autoimmunity. V: Autoantibodies (Second Edition)*, Elsevier, 2007: 7–12.
35. Lakota K, Zigon P, Mrak-Poljsak K, Rozman B, Shoenfeld Y, Sodin-Semrl S: *Antibodies Against Acute Phase Proteins. V: Autoantibodies (Third Edition)*, Elsevier, 2014: 67–73.
36. Casali P, Schettino E: *Structure and Function of Natural Antibodies. V: Immunology of Silicones*, Springer 1996: 167–179.
37. Poletaev A, Osipenko L: General Network of Natural Autoantibodies as Immunological Homunculus (Immunculus). *Autoimmunity Reviews* 2003; 2: 264–271.
38. Zuercher A W, Spirig R, Morelli A B, Käsermann F: IVIG in Autoimmune Disease – Potential Next Generation Biologics. *Autoimmunity Reviews* 2016; 15: 781–785.
39. Josephson S L: Immunoenzyme Techniques. *Clinical Microbiology Newsletter* 1985; 7: 81–84.
40. O’Kennedy R, Byrne M, O’Fagain C, Berns G: Experimental Section: A Review of Enzyme-immunoassay and a Description of a Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Immunoglobulin Concentrations. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 1990; 18: 136–140.

41. Rosenau B J, Schur P H: Antibody to Serum Amyloid A. *Journal of Autoimmunity* 2004; 23: 179–182.
42. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/western-blotting/transfer-proteins-western-blot/membranes-transfer-buffers-western-blotting/membranes-western-blotting/nitrocellulose-membranes-western-blotting.html>.
43. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/blocking-buffers-western-blot-elisa.html>.
44. Bell S A, Du Clos T W, Khursigara G, Picazo J J, Rubin R L: Autoantibodies to Cryptic Epitopes of C-reactive Protein and Other Acute Phase Proteins in the Toxic Oil Syndrome. *Journal of Autoimmunity* 1995; 8: 293–303.