

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DALIDA VIZJAK

**PRIMERJAVA DETEKCIJE AVTOPROTITELES PROTI SERUMSKEMU
AMILOIDU A Z ENCIMSKO IMUNSKO METODO NA TRDNEM NOSILCU IN
WESTERN PRENOSOM**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DALIDA VIZJAK

**PRIMERJAVA DETEKCIJE AVTOPROTITELES PROTI SERUMSKEMU
AMILOIDU A Z ENCIMSKO IMUNSKO METODO NA TRDNEM NOSILCU IN
WESTERN PRENOSOM**

**COMPARISON OF DETECTION OF AUTOANTIBODIES AGAINST SERUM
AMYLOID A BY ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY AND
WESTERN BLOTS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm. in somentorstvom dr. Snežne Sodin-Šemrl. Laboratorijsko delo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, KO za revmatologijo, SPS interna klinika, KC Ljubljana.

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Borutu Božiču, mag. farm. in somentorici dr. Snežni Sodin-Šemrl za strokovno vodenje in za vse nasvete pri eksperimentalnem delu in pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi celotnemu kolektivu Laboratorija za imunologijo revmatizma, še posebej Katji Lakota, za uvajanje in nasvete pri izvedbi diplomske naloge.

Prav tako se zahvaljujem staršem, fantu in prijateljem, da so me v času študija podpirali, mi pomagali in verjeli vame.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm. in somentorstvom dr. Snežne Sodin-Šemrl.

Ljubljana, 2009

Dalida Vizjak

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stane Srčič, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA	II
POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1. UVOD	1
1.1 VNETJE	1
1.1.1 Sistemske reakcije akutne faze	1
1.1.2 Kronično vnetje.....	2
1.2 SERUMSKI AMILOID A (SAA)	2
1.3 AVTOPROTITELESA PROTI SAA	5
1.4 AVTOIMUNOST IN AVTOPROTITELESA	7
1.5 METODE DETEKCIJE PROTITELES	8
1.5.1 SDS-PAGE	9
1.5.2 WESTERN PRENOS IN IMUNODETEKCIJA (IMMUNOBLOT)	9
1.5.3 ENCIMSKO IMUNSKA METODA NA TRDNEM NOSILCU (ELISA)	10
2. NAMEN DELA	11
3. MATERIALI IN METODE DELA	12
3.1 MATERIALI	12
3.1.1 Reagenti	12
3.1.2 Aparature in ostali materiali.....	13
3.1.3 Biološki material.....	14
3.1.4 Pufri in raztopine	14
3.2 METODE DELA	19
3.2.1 SDS-PAGE	19
3.2.2 WESTERN PRENOS IN IMUNODETEKCIJA	20
3.2.3 ENCIMSKO IMUNSKA METODA NA TRDNEM NOSILCU (ELISA)	21
3.2.4 DOLOČITEV ANALIZNE SPECIFIČNOSTI WB	22
3.2.5 DOLOČITEV LINEARNOSTI MERITVE KONCENTRACIJE SAA Z WB.....	24
3.2.6 DOLOČITEV ANALIZNE SPECIFIČNOSTI METODE ELISA	24
3.2.7 DOLOČITEV LINEARNOSTI MERITVE KONCENTRACIJE SAA Z anti-SAA ELISA	
26	
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1 DETEKCIJA PROTITELES PROTI SAA NA NITROCELULOZNI MEMBRANI PO SDS-PAGE IN WB	27
4.1.1 PRIKAZ ANALIZNE SPECIFIČNOSTI WB.....	27
4.1.2 LINEARNOST MERITVE KONCENTRACIJE SAA Z WB.....	32
4.1.3 PRIKAZ REZULTATOV PO WB IN KOLORIMETRIČNI DETEKCIJI	32
4.1.3.1 Zdravi krvodajalci	33

4.1.3.2	Bolniki z avtoimunskimi boleznimi	34
4.1.3.3	Bolniki s trombozami.....	36
4.1.4	PRIKAZ OBDELAVE REZULTATOV	37
4.2	DETEKCIJA PROTITELES PROTI SAA Z ENCIMSKO IMUNSKO METODO NA TRDNEM NOSILCU (anti-SAA ELISA).....	41
4.2.1	OVREDNOTENJE anti-SAA ELISA.....	41
4.2.1.1	DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST	41
4.2.1.2	NATANČNOST.....	42
4.2.1.3	PRIKAZ ANALIZNE SPECIFIČNOSTI METODE anti-SAA ELISA.....	44
4.2.1.4	LINEARNOST MERITVE KONCENTRACIJE SAA Z anti-SAA ELISA	47
4.2.2	DISTRIBUCIJA PODATKOV	48
4.2.3	PRIKAZ STATISTIČNIH SPREMENLJIVK.....	50
4.2.4	PRAŽNE MEJNE VREDNOSTI (»cut-off«).....	51
4.3	PRIMERJAVA NIVOJEV PROTITELES PROTI SAA Z NIVOJI SERUMSKE KONCENTRACIJE SAA	56
4.4	RAZLAGA.....	56
5.	SKLEPI.....	62
6.	LITERATURA.....	63
7.	PRILOGA.....	66

POVZETEK

Avtoprotitelesa predstavljajo v povezavi z avtoimunskimi boleznimi odklon od fizioloških in zaščitnih procesov ter so usmerjena proti molekulam lastnega organizma. Po drugi strani pa med imunskim odzivom tudi v normalnih razmerah nastajajo avtoprotitelesa, ki jih imenujemo »naravna« avtoprotitelesa. NAbs izpolnjujejo pomembne in mnogovrstne imunološke vloge, poskrbijo za zelo zgodnjo naravno imunsko zaščito, zagotovijo odstranitev morebitnih avtoantigenov in apoptotičnih celičnih ostankov ter verjetno tudi izboljšujejo kardiovaskularni profil. Avtoprotitelesa proti serumskemu amiloidu A (SAA) so prvič opisali leta 2004 v manjši skupini bolnikov s SLE, z globoko VT in nekaterimi drugimi vnetnimi avtoimunskimi boleznimi. Namen našega dela je bil dokazati prisotnost avtoprotiteles proti SAA in primerjati njihove ravni v večjem številu krvodajalcev, bolnikov s trombozo ter avtoimunskimi boleznimi. Uporabili smo encimsko imunsko metodo na trdnem nosilcu in prenos po Westernu ter primerjali ravni avtoprotiteles proti SAA z ravni antigena SAA.

V naši študiji smo določili presenetljivo pogosto prisotnost protiteles proti SAA v vseh testiranih skupinah, kar ni primerljivo z edino dosedanja študijo, saj smo zaznali prisotnost protiteles proti SAA pri 135 od 156 serumov (86,5%) s SDS-PAGE/WB. Ugotovili smo, da se večina protiteles veže na epitope mono in dimerne oblike SAA, zelo majhni del pa na multimerne oblike SAA. Pri vnetnih avtoimunskih boleznih (SLE, SLE+aPL in SAPS) smo ugotovili podobno populacijo protiteles z odsotnostjo protiteles proti dimerni obliki SAA, pri boleznih s trombotičnimi zapleti (PAPS, SAPS, AT in VT) pa visoko navzočnost protiteles proti večmernim oblikam SAA. Z ELISA pa smo zaznali protitelesa proti SAA pri 294 od 314 serumov (93,6%) v fiziološkem območju, medtem ko so nefiziološka protitelesa pod (2,6%) in nad (3,8%) prazno vrednostjo zastopana v majhnem in primerljivem deležu. Zanimivo je, da pri PAPS in SAPS nismo zaznali protiteles proti SAA nad in pod prazno vrednostjo, poleg tega pa določili prisotnost protiteles pod prazno mejo le pri bolnikih s SLE in AT. Z obema metodama smo opazili upad protiteles s shranjevanjem vzorcev normal. Visoka frekvenca avtoprotiteles pri zdravi populaciji nakazuje na regulatorno in fiziološko vlogo kot NAbs, poleg morebitne protivnetne vloge pa bi se lahko vključevala tudi v regulacijo avtoimunskih bolezni, saj smo poleg visokega % prikazali tudi korelacijo nivojev protiteles proti SAA z nivoji antigena SAA pri bolnikih s SLE, vendar so potrebne nadaljnje raziskave za razjasnitev njihove natančnejše vloge.

ABSTRACT

Autoantibodies have been defined as an aberration of a physiological and protective process, in association with autoimmune disease, which react against self-molecules. On the other hand, during an immune response in normal conditions there is a small amount of autoantibodies generated, which are designated as »natural« autoantibodies. NAbs fulfill important and diverse immunological roles, providing very early innate immune protection, ensuring removal of possible autoantigens and apoptotic cellular debris, and possibly also improving cardiovascular profile. Autoantibodies against SAA were first described in 2004 in patients with SLE, deep VT and other inflammatory autoimmune diseases. The aim of our work was to determine the occurrence of antibodies against SAA in a larger group of healthy donors, thrombotic patients and autoimmune patients, and compare their levels. We used enzyme-linked immunosorbent assay and Western blotting. Secondly, we compared levels of autoantibodies against SAA with levels of the SAA.

In our study, we have obtained surprisingly high levels of antibodies against SAA in all tested groups, which is not in line with the only previously published study. We have detected antibodies against SAA in 135 of 155 (86,5%) serum samples with SDS-PAGE/WB. We found that the highest number of antibodies recognise epitopes of SAA monomer and dimer and the minority epitopes recognized multimeric SAA. In inflammatory autoimmune diseases (SLE, SLE+aPL and SAPS) we found a similar population of antibodies with the absence of antibodies against dimeric SAA, whereas in diseases with thrombotic events (PAPS, SAPS, AT in VT) there was also a high presence of antibodies against multimeric SAA. With ELISA we have detected antibodies against SAA in 294 of 314 (93,6%) serum samples in the physiological range, while antibodies below (2,6%) and above (3,8%) cut-off are represented by a small but comparable portion. It is interesting that in patients with PAPS and SAPS we did not detect antibodies below or above cut-off, in addition, we detected antibodies below cut-off only in patients with SLE and AT. With both methods we observed a decrease of the levels of antibodies with the storage time of samples of healthy donors. High frequencies of the autoantibodies in the healthy population indicate a regulatory and physiological role as NAbs. These antibodies could play an important role in the regulation of autoimmune diseases in addition to a potential anti-inflammatory role, since we present a high % of antibodies in addition to a correlation between levels of antibodies against SAA and antigen SAA levels in patients with SLE, but further investigation is needed in order to elucidate their precise role.

SEZNAM OKRAJŠAV

IL-1	interlevkin-1
IL-6	interlevkin-6
IL-8	interlevkin 8
TNF-α in β	dejavnik tumorske nekroze alfa in beta
IFN-γ	interferon gama
C3a, C4a, C5a	aktivirani fragmenti komplementa
PAF	dejavnik aktivacije trombocitov (Platelet Activating Factor)
ACTH	adrenokortikotropni hormon
CRP	C- reaktivni protein
SAP	serumski amiloid P
SAA	serumski amiloid A
A-SAA	akutni serumski amiloid A
C-SAA	konstitutivni serumski amiloid A
ApoA-1	apolipoprotein A-1
HDL	lipoprotein visoke gostote
LDL	lipoprotein nizke gostote
oLDL	oksidiran lipoprotein nizke gostote
RNA	ribonukleinska kislina
DNA	deoksiribonukleinska kislina
SLE	sistemski lupus eritematozus
SLE+aPL	sistemski lupus eritematozus z antifosfolipidnimi protitelesi
PAPS	primarni antifosfolipidni sindrom
SAPS	sekundarni antifosfolipidni sindrom
AT	arterijska tromboza
VT	venska tromboza
antiSAA	protitelesa proti SAA
NAAbs	naravna avtoprotitelesa
MM	molekulska masa
M	molarnost (mol/L)
AK	aminokislina
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
WB	Western prenos (Western blotting)

ELISA	encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu
hrSAA	humani rekombinatni serumski amiloid A
BSA	goveji serumski albumin (bovine serum albumin)
SDS	natrijev dodecilsulfat
NC	nitroceluloza
TBS	s Trisom pufrana slanica (pH=7,4)
PBS	s fosfatnim pufrom pufrana slanica (pH=7,4)
DEA	dietanolaminski pufer (pH=9,8)
AP	alkalna fosfataza
NBT/BCIP	nitro-modro tetrazolijev klorid/ 5-bromo-4-kloro-3-indolil-1-fosfat
Malle pAb #5 in 6	poliklonska zajčja protitelesa proti človeškim SAA- sekvenca 5 in 6 (donirana od prof. Ernst Malle, Medical University of Graz)
Ā	povprečna absorbanca

1. UVOD

1.1 VNETJE

Vnetje je lokalna reakcija tkiva na poškodbo, za katero je značilno zaporedje različnih pojavov, vključujoč spremembe mikrovaskularizacije, kopičenje fagocitov, odstranjevanje škodljivih snovi in obnova tkiva. Začetni pojavi v mikrocirkulaciji so si podobni ne glede na to, ali je nastalo vnetje zaradi vdora bakterij, travmatske poškodbe, vnašanja škodljivih snovi ali kot odziv na tuje ali telesu lastne antigene (1). Vnetje je torej zaščitni odziv, katerega cilj je omejiti, odstraniti in/ali uničiti škodljive dejavnike, hkrati pa je vpleteno v vrsto dogodkov, ki povzročajo zdravljenje poškodovanega tkiva. Med popravljanjem se poškodovano tkivo lahko nadomesti z delitvijo nativnih parenhimskih celic (regeneracija), ali pa se zapolni s fibroblastnim tkivom (reparacija). Najpogosteje gre za kombinacijo obeh procesov. Lokalno se kaže kot rdečina, toplota, oteklina, bolečina in zmanjšana dejavnost vnetnega področja ali organa. Razlikujemo akutno in kronično vnetje (2,4).

Pri vnetju sodeluje več mediatorjev. Med njimi so kemokini, ki so skupina majhnih polipeptidov, ki delujejo kemotaktično in so aktivacijske molekule med izstopanjem levkocitov. Plazemski encimski mediatorji, predvsem bradikinin in fibrinopeptidi, povečajo prepustnost kapilar in venul, proteolitični encim plazmin pa razgradi fibrinski strdek v kemotaktične produkte in aktivira komplement. Različni fragmenti komplementa (C3a, C4a in C5a) delujejo kot opsonini in kemotaktično za nevtrofilce in monocite/makrofage. Lipidni vnetni mediatorji, ki izhajajo iz membranskih fosfolipidov, so tromboksani, prostaglandini, levkotrieni in faktor, ki aktivira trombocite (PAF- angl. Platelet Activating Factor). Citokini IL-1 (IL-1 α in IL-1 β), IL-6 in TNF- α pa posredujejo številne lokalne in sistemske spremembe, ki jih opažamo pri akutnem vnetju (1).

1.1.1 Sistemske reakcije akutne faze

Lokalno akutno vnetje spremlja sistemski odziv, imenovan tudi reakcija akutne faze, ki jo posreduje kombinirano delovanje citokinov IL-1, IL-6 in TNF- α ter vključuje povišano telesno temperaturo, povečano sintezo hormonov, npr. ACTH in hidrokortizona in povečano nastajanje levkocitov (levkocitoza). Reakcijo akutne faze predvsem zaznamuje sinteza številnih proteinov akutne faze v jetrih, kot so C-reaktivni protein (CRP), serumski amiloid A (SAA) in P (SAP), fibrinogen, ceruloplazmin, komponente komplementa C3 in

C4 ter drugi, ki so pomembni za vzpostavitev homeostaze in obrambe proti antigenom (1). Pri človeku sta glavna proteina akutne faze prav CRP in SAA (16).

1.1.2 Kronično vnetje

Če je imunski odziv dovolj močan in ustrezno izbran, pride v tkivu do razmeroma hitrega uničenja in odstranitve patogenih mikrobov. Če pa do tega ne pride (zaradi narave mikroorganizma, zaradi oslabljenega ali napačno uravnanega imunskega odziva), se razvije kronična oblika vnetja, za katerega je značilna dolgotrajna navzočnost antigena in obsežna okvara tkiva in/ali izguba funkcije tkiva ali organa. Za vzdrževanje kroničnega vnetja je potrebno medsebojno spodbujanje makrofagov in celic T pomagalk. Kronično vnetje lahko spremlja tudi številne avtoimunske bolezni, kjer lastni antigeni neprestano aktivirajo celice T, poleg tega pa predstavlja prisotnost avtoimunskih protiteles dodatni dejavnik tveganja za razvoj sekundarnih bolezni, kot so npr. kardiovaskularne bolezni (1). Med kroničnim vnetjem pride do neregulirane sinteze akutnih proteinov, med katerimi je eden najvišje izraženih in najbolj občutljivejših, SAA predlagan za standard v zdravstvu (10).

1.2 SERUMSKI AMILOID A (SAA)

Serumski amiloid A (SAA) obsega družino majhnih (12-14 kDa, 104-112 AK ostankov dolgih), različno izraženih apolipoproteinov (11). Glede na to, kako se odzovejo na vnetje, jih delimo na dva glavna razreda. SAA akutne faze vnetja (A-SAA), je eden glavnih pozitivnih reaktantov akutne faze vnetja v človeku (5). Njegova serumska koncentracija se kot odziv na vnetje, bakterijske in glivične infekcije, neoplazije, poškodbe tkiva, pri revmatoidnem artritisu in vaskulitisu lahko do 1000-krat poveča in preseže vrednosti 1 g/l v cirkulaciji. Manj izrazito povečanje koncentracije (do 100 mg/l) pa je opaženo pri virusni infekciji in SLE (5,7). Med vnetjem A-SAA asociira pretežno s tretjo frakcijo visokogostotnega lipoproteina (HDL₃) in nadomesti ApoA-1, ki je v normalnih fizioloških pogojih prevladujoč apolipoprotein na teh delčkih (5). Vezava na HDL naj bi imela protektivno vlogo pred degradacijo s proteolitičnimi encimi v plazmi (11). Drugi razred SAA predstavlja t.i. konstitutivni SAA (C-SAA), katerega ekspresija se med akutno fazo vnetja minimalno poveča. Za razliko od A-SAA je C-SAA vezan tako na normalni HDL, kot tudi na HDL akutne faze vnetja (5,6).

Poznani so štiri humani geni SAA, in sicer SAA1, SAA2, SAA3 in SAA4, ki so zbrani na kromosomi 11p15.1, vendar so le trije funkcionalni (SAA1, 2 in 4). SAA1 in SAA2 kodirata akutni SAA (A-SAA), ki koordinirano nastajata med akutno fazo odziva in si delita več kot 90% nukleotidno istovetnost. SAA3 pa je psevdogen, ki se zaradi vrinjenja dodatne baze v eksonu 3, pri ljudeh ne izrazi (ni potrjen transkripciji). Humani gen SAA4, je konstitutivno izražen gen, ki kodira C-SAA in je v nasprotju z A-SAA minimalno izražen in le v 53% oz. 55% identičen s proteinoma SAA1 in SAA2 (5,6). Glavni citokini, ki inducirajo prepisovanje genov A-SAA so IL-1 (IL-1 α in IL-1 β), TNF- α in IL-6. S citokini inducirano ekspresijo A-SAA ojačajo glukokortikoidi, ki se tudi sproščajo med vnetjem (5,6). Glavno mesto sinteze SAA so jetra, vendar se SAA1, SAA2 in SAA4 sintetizirajo tudi ekstrahepatično. Informacijska RNA (mRNA), ki kodira SAA, tako akutne faze kot konstitutivni, je prisotna tudi v glavnih celicah aterosklerotičnih lezij (monociti/makrofagi, gladko-mišične celice, endotelijske celice in penaste celice). SAA najdemo v številnih normalnih človeških tkivih: dojkah, gastrointestinalnem traktu, pljučih, ledvicah, vranici, možganih, placenti, koži, maščobnem tkivu in drugih (5,8,9). Plazemski nivo SAA je povečan tudi pri stanjih, ki predstavljajo povečano stopnjo tveganja za kardiovaskularne bolezni, kot so debelost, inzulinska rezistenca, metabolični sindrom, diabetes in pri avtoimunskih boleznih, kot so revmatoidni artritis, SLE ter SAPS (9).

A-SAA ima pomembno vlogo pri obrambi organizma med akutno faznim odzivom. Deluje preko različnih mehanizmov; spremeni transport oz. metabolizem lipidov, lahko stimulira vnetje, ali pa ima protivnetno delovanje (5). A-SAA kot stimulator vnetja inducira ekspresijo proteinaz (matriks metaloproteinaze, kolagenaze, stromelizin), encimov, ki razgrajujejo ekstracelularni matriks in so pomembni za obnovo tkiva po tkivni poškodbi (5). A-SAA inducira vnetne citokine, lahko pa tudi sam preko vezave na celične receptorje ali vezavna mesta deluje kot citokin. Veže se na iste receptorje kot kemoatraktanti kot so N-formil-metionil-levcil-fenilalanin (N-formil-Met-Leu-Pha) in kemokini (IL-8) ter tako deluje kot kemotaktični agens za vnetne celice kot so monociti, polimorfonuklearni levkociti (PMN) in limfociti T. Lokalna produkcija A-SAA vodi v aktivno kopičenje teh celic na mestu vnetja in ojačanje lokalnega vnetja (5).

A-SAA se po različnih poteh vpleta v metabolizem oz. transport lipidov. Asociacija A-SAA s HDL spremeni metabolizem HDL in reverzni transport holesterola ter podpira proaterogeno delovanje, saj SAA-HDL kompleksi signifikantno spremenijo protektivno funkcijo fiziološkega HDL (5). Poveča se transport holesterola perifernim celicam in s tem

dostavo lipidov, predvsem holesterola perifernim celicam, ki imajo povečane potrebe po holesterolu, za pospešitev regeneracije tkiva na mestu vnetja (5, 9). Nasprotno, v liposomu asociiran SAA2 in, ne pa tudi SAA1, posreduje odtok holesterola iz celic in tako pospeši odstranjevanje velikih količin holesterola, ki se sprosti na mestu tkivne poškodbe pri vnetju (5,9). V akutni fazi imunskega odziva A-SAA inducira različne encime, vključene v metabolizem holesterola (5). Prisotnost A-SAA zmanjša od HDL₃ odvisno aktivnost lecitin-holesterol aciltransferaze, zaradi česar se zmanjša esterifikacija holesterola, ter poveča aktivnost sekretornih fosfolipaz, ki cepijo triacilgliceride v glicerol in maščobne kisline na delcu HDL₃. Cirkulirajoči delci HDL₃ se transportirajo do jeter, kjer se privzame holesterol. Ta privzem se poveča, če so fosfolipidi cepljeni in holesterol ni esterificiran, to pa se odraža na redistribuciji holesterola iz sredice HDL₃ na površino delca, kar olajša privzem z hepatociti (6).

A-SAA tudi deluje protivnetno, tako da vpliva na interakcije med limfociti T in makrofagi ter na funkcijo limfocitov T pomagalk in tako zavira imunski sistem na antigene. A-SAA je močan inhibitor limfocitov, inhibira z IL-1 in TNF inducirano povišanje telesne temperature preko inhibicije sinteze prostaglandina E₂ v hipotalamusu. A-SAA inhibira agregacijo trombocitov ter inducira sintezo prostaglandina I₂, ki ima tudi antiagregatorno delovanje, ter izdelovanje protiteles. A-SAA se veže na nevtrofilne levkocite in zavira oksidativni izbruh ter tako preprečuje oksidativno poškodbo tkiva med vnetjem (5,6,11).

Hitro povišanje SAA med infekcijo in akutnim vnetjem je za organizem ugodno, medtem ko je zmerno, kronično povišanje SAA, ki spremlja bolezni kot so metabolni sindrom, diabetes tipa 2 in druge kronične vnetne bolezni, lahko za organizem uničujoč (9). Podaljšana ekspresija A-SAA in posledično dalj časa trajajoča produkcija proteinaz lahko vodi v nastanek degenerativnih bolezni kot je npr. revmatoidni artritis (5). Zadrževanje delčkov HDL na žilni steni, ki ga posreduje SAA, pa vodi v nastanek penastih celic in razvoj aterosklerotičnih leh (9). Tako bi lahko bila kronično povišana koncentracija SAA značilen dejavnik, ki bi napovedovala tveganje za aterotrombotične zaplete kot tudi kardiovaskularne bolezni (9,10), poleg tega pa ocenjujejo, da bi SAA kot označevalec vnetja lahko bil klinično uporaben pri diagnozi in prognozi vnetnih in avtoimunskih bolezni (7). SAA je bil dokazan tudi kot dober napovedovalec smrtnosti v akutnih koronarnih sindromih (13).

Kronično povišana ekspresija A-SAA lahko vodi v razvoj sekundarne ali reaktivne amiloidoze, progresivne smrtne bolezni, pri kateri se proteolitični fragment A-SAA (76-

AK ostanek N-terminalnega dela SAA) imenovan Amiloid A (AA) odlaga v obliki netopnih leh v glavnih telesnih organih, kot so jetra, ledvica in vranica (6). Amiloidni depoziti imajo običajno tri sestavine. Več kot 90% amiloida predstavlja amiloidni fibrilarni protein (prevladujejo derivati SAA1 proteina), v katerem običajno prevladuje sekundarna struktura β -nagubanega lista. Ostali sestavini amiloida sta komponenta P (serumski amiloid P) in glukozaminoglikan (heparan sulfat in heparin) (5). AA amiloidozo poznamo kot sekundarno ali reaktivno amiloidozo, ki lahko nastane kot posledica kronične okužbe, vnetja ali maligne bolezni (12).

1.3 AVTOPROTITELESA PROTI SAA

Leta 2004 sta bila Rosenau in Schur (14) prva, ki sta poročala o detekciji protiteles proti SAA in njihovi asociaciji z različnimi kardiovaskularnimi boleznimi, vključujoč globoko VT, stenozo aorte, kapi in atrijsko fibrilacijo kot tudi sistemski lupus eritematosus (SLE), ki je sistemska vezivnotkivna vnetna avtoimunska bolezen, pri kateri so prizadeti različni organi in organski sistemi, med njimi lahko tudi kardiovaskularni. Od takrat je splošno pomanjkanje informacij o prisotnosti tako pri zdravi populaciji kot bolnikih.

V študiji Rosenaua in Schura je bilo odkrito, da protitelesa proti SAA ne inhibirajo SAA v raztopini, torej v njegovi nativni obliki, vendar le po imobilizaciji SAA na negativno nabito površino, tj. obsevano EIA ploščo. Ta opažanja napeljujejo k mnenju, da vezava SAA na ploščo in morda tudi na celice *in vivo* povzročijo razvitje proteina tako, da se izpostavijo »neoantigenski« epitopi, zato sta predlagala, da se protitelesa proti SAA tvorijo ne proti nativni obliki SAA, ki je normalno prisotna v telesu, ampak proti neoepitopom, ki so sedaj prepoznavni kot antigenski in/ali tuji. To priča k dejstvu, da je konformacijska sprememba proteina kritična za prepoznavo s protitelesi proti SAA (14).

Vloga SAA pri SLE še ni povsem pojasnjena. Nivo SAA je ponavadi normalen pri bolnikih s SLE, vendar se poviša v prisotnosti travme in/ali infekcije (14). V študiji sta Rosenau in Schur določila značilni delež (75%) bolnikov s SLE, ki so imeli protitelesa proti SAA, podobne rezultate pa sta dobila tudi za CRP/anti-CRP sistem. Bolniki s SLE lahko imajo normalen nivo CRP, vendar lahko razvijejo protitelesa proti CRP (14). Kot pri protitelesih proti SAA, protitelesa proti CRP reagirajo le z antigeni, ki se po vezavi na površino konformacijsko spremenijo in ne z molekulami CRP v raztopini, kar nakazuje na dejstvo, da se protitelesa proti CRP kot tudi protitelesa proti SAA verjetno vežejo na CRP oz. SAA preko specifičnega kofaktorja/receptorja (14, 15). Domnevajo, da CRP preko

FcγR posredovanega privzema v fagocite olajša odstranjevanje nekoristnih molekul, tako eksogenih (mikroorganizmi in njihovi produkti) kot tudi avtolognih produktov, kot so cirkulirajoči nukleosomi in apoptotična telesca, na katerih so izpostavljeni jedrni antigeni (DNA, histoni, ekstrakromosomski jedrni antigeni, kot so Ro/SS-A, La/SS-B, Sm in snRNP), pri tem pa omejujejo stik teh avtoantigenov s specifičnim imunskim sistemom (16, 18). V vnetem kislem okolju, pod vplivom visoke koncentracije sečnine ali nizke/visoke koncentracije Ca^{2+} , nativni CRP (pentamer) ireverzibilno disociira v monomere CRP (mCRP), ki se vežejo na IgG vsebujoče imunске komplekse in na receptorje Fcγ razreda III (nizko afinitetni receptorji) (16). Na ta način bi lahko mCRP spodbujal specifično vezavo imunskih kompleksov na fagocitne FcγR-je in tako bil udeležen pri prepoznavi in odstranjevanju imunskih kompleksov in jedrnega materiala iz apoptotičnih celic *in vivo*, hkrati pa bile molekule mCRP izpostavljene na celičnih površinah tarče za avtoprotitelesa proti CRP. Zato predvidevajo, da bi lahko avtoprotitelesa proti CRP preprečila z mCRP posredovano fiziološko odstranitev teh komponent (17), s čimer se poveča tveganje za ekstrahepatično odlaganje imunskih kompleksov ter posledično s komplementom posredovano vnetje v tarčnih organih (16). Zelo verjetno pa prisotnost protiteles proti CRP ne pojasnjuje relativne nizke koncentracije CRP pri bolnikih s SLE, ampak je bolj relevantno dejstvo, da je izpostavitve skritih epitopov na konformacijsko spremenjenih antigenih in/ali posttranslacijska modifikacija (glikozilacija in/ali citrulinizacija) molekule CRP in s tem izpostavitve neoepitopov vzrok nepopolnemu odstranjevanju cirkulirajočih CRP ter indukciji protiteles proti CRP (16). Avtoprotitelesa proti CRP so večinoma IgG razreda in uperjena proti modificirani obliki oz. neoepitopom CRP (mCRP), poleg tega pa tudi korelirajo z aktivnostjo SLE (16). mCRP so odkrili tudi pri drugih vnetnih boleznih, kot je RA, zato je možno, da kronična vnetna poškodba tkiva v sistemskih avtoimunskih boleznih lahko vodi v povečano predstavitev konformacijsko spremenjenih epitopov na CRP in drugih akutno faznih proteinih, ki lahko izzovejo imunski odziv in s tem povečano ekspresijo MHC razreda II in T celične aktivacije, kar vodi v diferenciacijo B celic in tvorbo avtoprotiteles (17).

Zdi se, da lahko veliko humanih molekul pridobi avtoantigenost, vključno z oksidiranimi LDL (ox-LDL), β_2 -glikoprotein I (β_2 -GPI), protrombin, kardiolipin (CL), IgG (revmatoidni faktor), α_1 -antitripsin, fibrinogen, ceruloplazmin, CRP in SAA (15). Veliko študij sugerira, da so povišane koncentracije teh avtoprotiteles povezane z

aterosklerotičnimi in/ali tromboemboličnimi zapleti, vendar sta Rosenau in Schur mnenja, da so protitelesa proti SAA primarno kardiovaskularne narave (14).

1.4 AVTOIMUNOST IN AVTOPROTITELESA

Avtoimunost je imunski odziv proti antigenom lastnega tkiva, ki je posledica porušena mehanizmov, ki normalno vzdržujejo toleranco (neodzivnost) do lastnega. Možnost za nastanek avtoimunosti obstaja pri vsakem posamezniku, kajti vsi dedujejo gene za limfocitne receptorje, ki lahko spoznajo lastne antigene. Potencialno imunogeni antigeni so navzoči na celicah, v krvnem obtoku in na vezivnem tkivu vseh posameznikov. Avtoimunost se normalno prepreči s selekcijo (klonska delecija) v timusu, ki deluje na razvijajoče se limfocite in ki omogoča, da je repertoar zrelih limfocitov toleranten do lastnih antigenov. Prepreči se tudi z mehanizmom, ki inaktivira kljub negativni selekciji dozorele limfocite, reaktivne z lastnimi antigeni (1). Izguba tolerance je posledica:

- nenormalne selekcije klonov, reaktivnih z lastnim
- nenormalne stimulacije limfocitov, ki so normalno anergični za lastne antigene
- sproščanja lastnih antigenov, ki so normalno nedostopni imunskemu sistemu (1)
- ali spremembe lastnih antigenov do take mere, da jih imunski sistem ne prepozna več kot lastne (1,19).

K nastanku avtoimunske bolezni prispevajo številni dejavniki. Ti vključujejo imunske abnormalnosti, genetično ozadje, ki predisponira k avtoimunosti, lokalne spremembe tkiva in mikrobne okužbe. Pri nastanku avtoimunskih bolezni sodelujejo predvsem krožeča avtoimunska protitelesa, imunski kompleksi in avtoreaktivni limfociti T (1).

Avtoimunske bolezni so lahko sistemske ali za organ specifične. Pri avtoimunskih boleznih, specifičnih za organ, je imunski odziv usmerjen na tarčni antigen, ki je samo v določenem organu ali žlezi, tako da so manifestacije omejene v glavnem na ta organ. Pri teh se avtoreaktivni limfociti ali avtoprotitelesa vežejo na antigene celičnih membranskih molekul, kar povzroči lizo celic in/ali vnetje v prizadetem organu. Pri sistemskih avtoimunskih boleznih je prizadetih več organov in tkiv, saj so tarča napada predvsem številni organsko nespecifični antigeni, ki so navzoči bodisi v krvnem obtoku ali pa so sestavine celic (npr. DNK, centromeri, citoplazemske sestavine). Med sistemske avtoimunske bolezni uvrščamo SLE in antifosfolipidni sindrom (APS) (1).

Celice B (CD5⁺ B1 celice), reaktivne za lastne antigene, najdemo v normalnih posameznikih, ki izločajo majhno količino avtoprotiteles s šibko afiniteto, navadno razreda IgM (v manjši meri pa tudi monoreaktivna IgG protitelesa, ki jih producirajo CD5⁻ B celice), in ki so nastala brez znane imunizacije in ne potrebujejo eksogene antigenske stimulacije za njihovo tvorbo, imenujemo »naravna« avtoprotitelesa (NAbs) (1,19). NAbs so prva obrambna črta pri vdoru različnih mikroorganizmov. Njihov pomen pri obrambi pred okužbo se kaže tudi v tem, da so to filogenetsko prvobitna protitelesa. Poleg reaktivnosti za tuje antigene se NAbs vežejo tudi s številnimi avtolognimi antigeni, npr. s hormoni (inzulin), s celičnimi komponentami (DNA, histoni, mielinski bazični protein (MBP) in drugi) in z imunoglobulini (RF) (1). Večina teh avtoprotiteles, je polispecifičnih, ki spoznajo številne različne antigene (lastne in tuje) in ne povzročajo okvar tkiva. Nekatera od teh avtoprotiteles spoznajo denaturirane ali spremenjene lastne in tuje antigene (Grabar, 1983), za katere trdijo, da so mehanizem za odstranjevanje nekoristnih molekul (1,20). Poleg fiziološke funkcije imajo NAbs tudi protektivno vlogo (Cohen in Cooke, 1986) pred vdorom tujih antigenov, ki lahko po naključju vsebujejo križno reaktivne lastne epitope. Molekulska mimikrija je eden od vzrokov, zakaj lahko imunski odziv na tuje antigene povzroči reaktivnost proti lastnim in eden od mehanizmov za razvoj avtoimunosti (1,22). Zgled za tak pojav je SLE, kjer protitelesa, ki so zelo verjetno nastala proti virusni DNA, križno reagirajo z gostiteljevo DNA (1). Nasprotno pa izdelujejo bolniki z nekaterimi avtoimunskimi boleznimi velike količine NAbs razreda IgG, ki spoznavajo lastne determinante z veliko afiniteto in povzročajo patološke spremembe (1). Avtoprotitelesa prisotna pri normalnih posameznikih so ista kot protitelesa, ki se tvorijo pod patogenimi pogoji, v smislu avidnosti in specifičnosti do antigenov, a se razlikujejo v njihovi kvaliteti in specifičnosti epitopov (19,20). Ugotovili so, da visok titer NAbs IgG korelira z aktivnostjo bolezni pri bolnikih s SLE in PAPS (21).

1.5 METODE DETEKCIJE PROTITELES

Med najpomembnejše preiskave laboratorijske diagnostike vnetnih (avtoimunskih) bolezni zagotovo sodijo imunoserološke preiskave, s katerimi v serumih ugotavljamo prisotnost različnih protiteles. Osnova vseh testov, s katerimi določamo protitelesa v humanih serumih, temelji na »*in vitro*« interakciji med antigenom in protitelesi. Za identifikacijo nastalega imunskega kompleksa pa se uporabljajo različne imunokemijske metode in sicer: indirektna imunofluorescenca, indirektna ELISA, elektroforetske metode (SDS-

PAGE/Western prenos, protitočna elektroforeza,...), radioimunske metode (RIA) in precipitacijske metode v gelu (dvojna in enojna radialna imunodifuzija). Protitelesa močno in specifično vežejo posamezne antigene v vzorcu, kar omogoča, da z imunokemijskimi metodami ugotavljamo prisotnost zelo majhnih količin snovi v kompleksnih vzorcih. Pri vseh seroloških metodah problem predstavljajo lažno pozitivni in/ali lažno negativni rezultati, zato potrebujemo za razrešitev kombinacijo več metod, saj analitske sposobnosti katerega koli serološkega testa, zaradi izjemne biološke variabilnosti, niso optimalne.

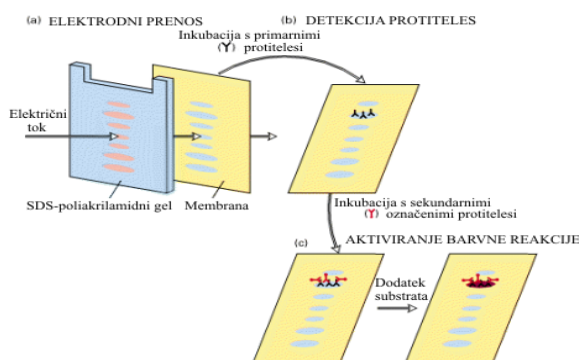
1.5.1 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECILSULFATA (SDS-PAGE)

Elektroforeza je kvalitativna separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih makromolekul (proteinov) v električnem polju (23, 26). Z elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS) ločujemo proteine glede na njihovo MM oz. velikost. Pri SDS-PAGE proteinski vzorec najprej obdelamo z anionskim detergentom SDS in zmes segrevamo pri 95 °C, da zagotovimo popolno denaturacijo proteinov. Hkratna obdelava proteinskega vzorca z reducentom, kot sta β -merkaptotanol in ditiotritol, še nadalje denaturira protein z razcepom disulfidnih vezi in tako povzroči ločitev podenot proteina na gelu (23, 28). Na gram proteina se vedno veže 1,4 g SDS, kar ustreza približno eni molekuli SDS na dva aminokislinska ostanka, tako da naboj kompleksa prevlada nad nabojem proteinov, zaradi česar se vsi proteini pod napetostjo gibljejo proti anodi ter imajo enako razmerje naboj:masa in podobno paličasto obliko, zato postane njihova mobilnost v gelu odvisna izključno od njihove velikosti (24, 29). Tako kompleksi z nizko MM lažje in hitreje potujejo skozi pore gela kot tisti z veliko MM, ki v gelu potujejo počasneje (23, 26).

1.5.2 WESTERN PRENOS IN IMUNODETEKCIJA (IMMUNOBLLOT)

Western prenos (angl. Western blotting) je kvalitativna tehnika za identifikacijo in karakterizacijo specifičnih proteinov v kompleksni zmesi proteinov. Izraz blotting se nanaša na prenos proteinov iz gela na membrano s pivnanjem po izvedeni SDS-PAGE in njihovo imunodetekcijo (25). Proteine moramo iz poliakrilamidnega gela najprej prenesti na membrano s kapilarnim ali pogosteje elektroforeznim prenosom (1,23), kateremu sledi imunokemična detekcija, kjer izpostavimo membrano raztopini primarnih protiteles, nato pa dodamo z encimom konjugirana sekundarna protitelesa, ki se vežejo na Fc- regijo

primarnih protiteles (23). Vizualizacijo proteinov pa dosežemo z inkubacijo membrane v raztopini brezbarvnega substrata, ki se na mestu vezave sekundarnih protiteles pretvori v obarvan produkt, ki ga detektiramo (25, 31). Prednost prenosa Western je, da so antigeni izpostavljeni na membrani in imobilizirani. Neposredno prekritje gela s protitelesi daje namreč manjšo ločljivost zaradi prodiranja v gel in zaradi difuzije antigenov (1). Glavna omejitev te metode je, da denaturirani proteini, ki so vezani na membrani, ne vsebujejo več



identičnih konformacijskih in strukturnih antigenskih determinant kot v nativnem proteinu. Zato bodo uporabna le tista protitelesa, ki bodo prepoznala antigenske determinante s specifično AK sekvenco, karbohidratno skupino, ipd. (27).

Slika 1: Prenos proteinov na membrano in njihova detekcija (Western blot) (26).

1.5.3 ENCIMSKO IMUNSKA METODA NA TRDNEM NOSILCU (ELISA)

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je občutljiva imunološka metoda, s katero lahko kvalitativno in kvantitativno določimo antigene ali protitelesa v telesnih tekočinah (navadno serumu) ali celičnih ekstraktih. Za kvantitativno določitev pripravimo umeritveno krivuljo z znanimi koncentracijami antigena ali protitelesa. ELISA se odlikuje po svoji hitrosti, visoki občutljivosti, specifičnosti in zmogljivosti ter po enostavni izvedbi in avtomatizaciji (1,23,32).

Protitelesa v vzorcih določamo z indirektno metodo ELISA, kjer uporabljamo mikrotitersko ploščico prekrita s specifičnimi antigeni proti tarčnemu protitelesu. Ploščico najprej inkubiramo v raztopini seruma, v katerem je primarno protitelo, nato pa dodamo z encimom konjugirana sekundarna protitelesa, ki se vežejo na Fc regijo primarnih protiteles (25, 30). Po odstranitvi nevezanih sekundarnih protiteles s spiranjem, dodamo brezbarven substrat, ki se pretvori v obarvan produkt (30, 32). Izmerjen obseg encimske reakcije je proporcionalen količini vezanega sekundarnega protitelesa, ki pa je direktno povezana s količino primarnih protiteles za vezavo na antigen (32, 34). Za to metodo je ključnega pomena uporaba encimskih konjugatov z visoko specifično aktivnostjo, kar dosežemo z uporabo afinitetno očiščenih protiteles (25). Glavna slabost metode pa je, da vezava proteinov na trdno površino lahko prekrije ali spremeni konformacijo epitopov (34).

2. NAMEN DELA

Serumski amiloid A (SAA) je akutno fazni protein, katerega koncentracija se dramatično poveča med akutnim in kroničnim vnetjem pri ljudeh in živalih. SAA kot označevalec vnetja bi lahko bil uporaben pri diagnozi in prognozi vnetnih in avtoimunskih boleznih. SAA tudi igra pomembno vzročno vlogo v aterosklerozi in predstavlja označevalec za povečano smrtnost v srčno žilnih boleznih. Leta 2004 sta bila Rosenau in Schur prva, ki sta poročala o detekciji protiteles proti SAA in njihovi asociaciji z različnimi boleznimi, vključujoč globoko vensko trombozo in sistemski lupus eritematosus (SLE), vendar je bila slabost študije malo število bolnikov. Od takrat je splošno pomanjkanje informacij o prisotnosti protiteles proti SAA tako pri zdravi populaciji kakor tudi pri različnih bolnikih.

Zato so naši **glavni cilji** v diplomski sledeči:

1. Uvesti in prilagoditi metodiko *hišne izvedbe metode* ELISA za detekcijo protiteles proti SAA.
2. Določiti nivoje (prisotnost) protiteles proti SAA v zdravih krvodajalcih.
3. Določiti nivoje (prisotnost) protiteles proti SAA v skupini bolnikov z avtoimunskimi boleznimi in trombozami.
4. Primerjati nivoje protiteles proti SAA z nivoji antigena SAA v serumih krvodajalcev in skupin bolnikov.
5. Primerjati rezultate Western prenosa z ELISA.

Nameravamo dokazati prisotnost protiteles proti SAA v večjem številu krvodajalcev, bolnikov z avtoimunskimi boleznimi in trombozami, ter primerjati njihove nivoje. Uporabili bomo dve različni metodi za določitev protiteles proti SAA ter primerjali nivoje protiteles z nivoji antigena SAA.

3. MATERIALI IN METODE DE LA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti

- Akrlamid/bis-akrlamid, 30% raztopina, reagent za elektroforezo, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- Amonijev persulfat (APS), $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 98% raztopina, reagent za elektroforezo, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED), $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}=\text{CHN}(\text{CH}_3)_2$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- Natrijev dodecilsulfat (SDS), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$, elektroforezna čistost, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, ZDA
- 1-Step™ NBT/BCIP, Pierce, Rockford, ZDA
- Natrijev klorid (NaCl) analitske čistote, Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Nemčija
- Tris (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol), $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, analitske čistote, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Tween®20 (polioksietilen sorbitan monolavrat), SigmaUltra, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- Glicerol, $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$, Lex d.o.o., Portorož, Slovenija
- 2-merkaptetanol, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, elektroforezne čistote, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Bromfenolno modro, Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Nemčija
- p-nitrofenilfosfat, $\text{C}_6\text{H}_4\text{NNa}_2\text{O}_6\text{P}$, 5 mg tablete, Sigma, St. Louis, ZDA
- Glicin ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$) analitske čistote, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Metanol (CH_3OH) analitske čistote, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
- Kalijev klorid (KCl) analitske čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) analitske čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) analitske čistote, Merck, Darmstadt, Nemčija

- Natrijev hidroksid (NaOH) analitske čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Klorovodikova kislina (HCl) analitske čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška

3.1.2 Aparature in ostali materiali

- Elektroforezna kadička za SDS-PAGE: Mini 2-D Cell, Bio-Rad, Richmond, ZDA
- Elektroforezna kadička za WB: Mini Protean II™, Bio-Rad, Richmond, ZDA
- Generator napetosti toka Bio-Rad, Model 1000/500 Power Supply, Bio-Rad, Richmond, ZDA
- Polistirenske mikrotiterske ploščice Costar High Binding 3590, 96 Well EIA/RIA Plates, Corning, New York, ZDA
- Spektrofotometrični čitalec mikrotiterskih plošč RainBow Thermo, Tecan Sunrise, Männedorf, Švica
- Vodna kopel, tip1003, GFL, Hannover, Nemčija
- Avtoklav A-11, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- Centrifuga Universal 32R: tip 1610, Hettich zentrifugen, Tuttingen, Nemčija
- Centrifuga Mini spin plus, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Gugalnik, Heidolphinstruments, Promax 1020, Nemčija
- Vibracijski mešalnik, Assister, Nemčija
- Pipete, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Sterilni pipetni nastavki 10 µL, 100 µL, 1000 µL, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Pipetni nastavki 10 µL, 100 µL, 1000 µL, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Nitrocelulozna membrana, Schleicher & Schuell, Dassel, Nemčija
- Injekcijska brizga Hamilton Syringe Model 1701N in 1705N, kapaciteta: 10 µL in 50 µL, Sigma, Saint Louis, ZDA
- Inkubator: Heto Holten Cellhouse tip 154, Astel. Francija
- Aparat za verižno reakcijo s polimerazo (PCR), Thermal Cycler 2720, Applied biosystems, Foster City, CA, ZDA
- pH meter Mettler Toledo SevenEasy, Columbus, Ohio, ZDA
- Precizna tehtnica Mettler Toledo, type PM2500, Mettler Toledo AG, Greifensee, Švica
- Droben laboratorijski pribor (magnetna mešala, epruvete, steklovina, filtrirni papir,...)

3.1.3 Biološki material

- Testirali smo **156** humanih serumov s SDS-PAGE/WB in **314** humanih serumov z ELISA-o. Skupine bolnikov so vključevale SLE (n= 9 oz. 14), SLE+aPL (n= 9 oz. 20), PAPS (n= 9 oz. 23), SAPS (n= 9 oz. 25), vensko (n= 21 oz. 22) in arterijsko trombozo (n= 21 oz. 31). Vzorci krvodajalcev so shranjeni različno dolgo, zato smo zaradi možnosti vplivanja starosti kot tudi večkratnega odmrzovanja vzorcev in različnih vplivov okolja, na prisotnost protiteles proti SAA v serumih, razdelili le-te v tri skupine: N1- manj kot 3 leta stari serumi (n= 41 oz. 126), N2- med 3 in 6 let stari serumi (n= 9 oz. 25) in N3- med 6 in 13 let stari serumi normal (n= 28). Humani serumi teh oseb so bili pridobljeni iz obstoječih bank Laboratorija za imunologijo revmatizma, Klinični oddelek za revmatologijo SPS interne klinike KC Ljubljana. Vse osebe so bile seznanjene in so soglašale z namenom uporabe njihovih serumov.
- Označevalec molekulske mase: SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Lot# LC5925, Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- Protein A/G PLUS- Agarose, sc-2003, Lot# K2707, reagent za imunoprecipitacijo, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ZDA
- Rekombinantni humani Apo- Serumski Amiloid A, stock conc.=1mg/mL, Lot# 090766 J2307, Peprotech, London, Velika Britanija
- Rekombinantni humani Serumski amiloid A ELISA Kit, koncentrat konjugiranega anti-SAA (100x), Lot# 24197-01S, BioSource, Camarillo, CA, ZDA
- Rekombinantni kozji imunoglobulin G (IgG) označen z alkalno fosfatazo (AP)
- Zajčja monoklonska protitelesa proti humanemu SAA (številka 5 in 6), ki nam jih je posređoval profesor Malle iz Avstrije
- Mleko: Instant posneto mleko v prahu, Pomurske mlekarne d.o.o., Murska Sobota, Slovenija
- Goveji serumski albumin, brez esencialnih maščobnih kislin, BSA* Cohn Fraction V, Lot# 048K7400, Sigma- Aldrich Co., St. Louis, ZDA

3.1.4 Pufri in raztopine

Za SDS PAGE:

- Za 1 minigel:

	Ločitveni gel (10%)	Koncentracijski gel (4%)
AA/Bis	1,17 ml	0,32 ml
10 ut/vol % SDS	35 µl	24 µl
Pufer 1	0,88 ml Tris-Cl pH 8,8	
Pufer 2		0,6 ml Tris-Cl pH 6,8
dH ₂ O	1,44 ml	1,4 ml
10 ut/vol % APS	21 µl	8 µl
TEMED	42 µl	8 µl

Pufer 1 : 1,5 M Tris-Cl pH 8,8

Pufer 2: 0,5M Tris-Cl pH 6,8

- Pufri za pripravo gelov:

<u>1,5 M Tris-Cl, pH 8,8:</u>		<u>0,5 M Tris-Cl, pH 6,8:</u>	
TRIS	18,2 g	TRIS	6,1 g
dH ₂ O	100 ml	dH ₂ O	100 ml
umerimo s HCl do pH 8,8		umerimo s HCl do pH 6,8	

- Pufer za vzorce (reducirajoči SDS pufer): 4x koncentriran – proteinski vzorec pripravimo tako, da je končna koncentracija vzorčnega pufra 1x

Tris-Cl pH 6,8	250 mM	5 ml
SDS	8 ut/vol %	1,6 g
glicerol	40 vol/vol %	8 ml
2-merkaptoetanol	20 vol/vol %	4 ml
bromfenolno modro	0,02 ut/vol %	4 mg
dH ₂ O		do 20 ml

- Pufer za elektroforezo- **spodnji**; 10x koncentriran (pred uporabo ga razredčimo na 1x):

Tris	30 g
Glicin	145 g
dH ₂ O	do 1000 ml

- Pufer za elektroforezo- **zgornji**:

1x koncentriranemu spodnjemu pufru dodamo SDS do koncentracije 0,1% (1 ml 10% raztopine SDS na 100 ml pufra).

- 10 ut/vol % SDS:

SDS	10 g
dH ₂ O	do 100 ml

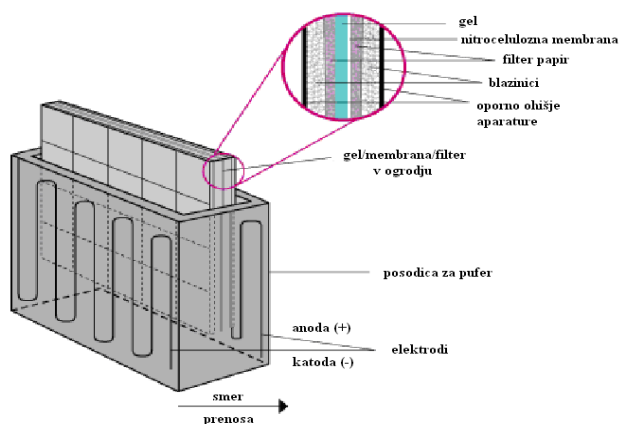
- 10 ut/vol % amonijev persulfat (APS):

APS	10 g
dH ₂ O	do 100 ml

Za prenos proteinov na nitrocelulozo (Western blotting):

- Blot pufer za prenos proteinov na NC membrano (pred uporabo dodamo 1,5 ml 10% raztopine SDS na liter pufra). Za en prenos potrebujemo 800 ml pufra.

Glicin	72 g
Tris	15 g
Metanol	1000 ml
dH ₂ O	5000 ml



Slika 2: Shema naprave za prenos proteinov na NC membrano (Western blot) (33).

Za imunsko detekcijo na pivniku:

- Blokirajoč pufer:

Posneto mleko v prahu	25 g
Tween® 20	0,25 g
TBS pufer (pH 7,4)	do 500 ml

- TBS pufer (s Tris-om pufrana fiziološka raztopina- pH 7,4):

Tris-HCl	0,605 g
NaCl	4,385 g
dH ₂ O	do 500 ml

- TBS+Tween® 20 pufer (s Tris-om pufrana fiziološka raztopina + Tween- pH 7,4):

Tris-HCl	0,605 g
NaCl	4,385 g
Tween® 20	0,25 g
dH ₂ O	do 500 ml

Za anti-SAA ELISA:

- PBS pufer (s fosfatom pufrana fiziološka raztopina- pH 7,4):

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
NaCl	8 g
KCl	0,20 g
dH ₂ O	do 1000 ml

- PBS+Tween® 20 pufer (s fosfatom pufrana fiziološka raztopina + Tween- pH 7,4):

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
NaCl	8 g
KCl	0,20 g
Tween® 20	1,0 g
dH ₂ O	do 1000 ml

- BSA- PBS + Tween®20 pufer (pH 7,4):

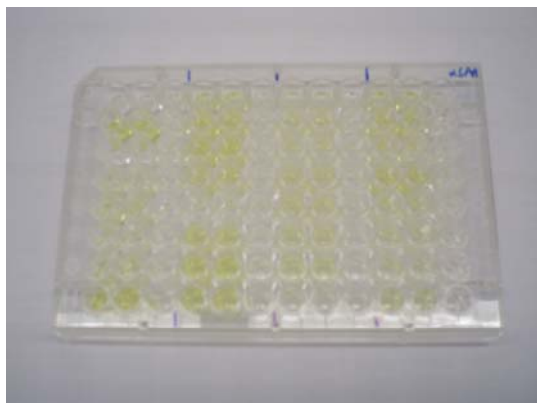
Goveji serumski albumin	1,0 g
PBS + Tween® 20 pufer	100 ml

- BSA-PBS pufer (pH 7,4):

Goveji serumski albumin	1,0 g
PBS pufer	100 ml

- Priprava substrata v končni koncentraciji 2g/l:

DEA pufer (pH 9,8)	5 ml
p-nitrofenilfosfat	2 tableti



Slika 3: Mikrotiterska plošča, na kateri se izvaja anti-SAA ELISA.

3.2 METODE DELA

3.2.1 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECILSULFATA (SDS-PAGE)

Humani rekombinantni SAA (hrSAA) (Peprtech, UK) smo ločili s SDS-PAGE, ki je metoda za ločevanje proteinov (glede na velikost) v gelu pod vplivom električnega toka. Postopek smo izvajali po osnovnem opisu v referenci 27, ki smo ga nekoliko prilagodili.

Sestavili smo celico za vertikalno elektroforezo, tako da smo dve stekleni plošči ločili z vmesniki debeline 0,75 mm. Stekla smo predhodno dobro očistili z detergentom in razmastili z 98% etanolom. Nato smo pripravili 13,6 mL 10 % ločitvene mešanice, kateri smo tik pred uporabo dodali 21 μ L APS in 42 μ L TEMED. Rastopino smo pipetirali med stekleni plošči do 3 cm od vrhnjega roba, čezenj pa smo po ~1 minuti previdno nalili še destilirano vodo z brizgo, da se gel ne bi izsušil. Po približno 15 minutah, ko je gel polimeriziral, smo vodo nad gelom s filter papirjem previdno popivnali. Na ločitveni gel smo pipetirali 2,4 mL 4% koncentracijske mešanice, kateri smo tik pred uporabo dodali 8 μ L APS in 8 μ L TEMED, ter vstavili glavniček pod kotom, s čimer smo izpodrinili zrak (slika 4). Polimerizacija koncentracijskega gela je potekala približno 5 minut. V primeru,

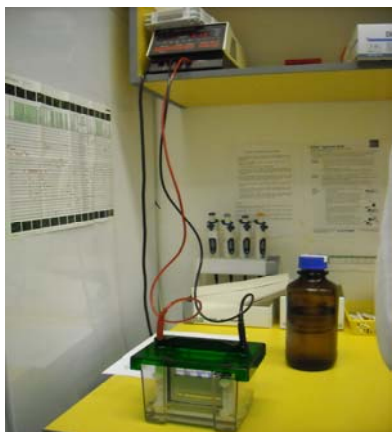


da smo elektroforezo nadaljevali naslednji dan, smo gel zaščitili s parafilnom pred izsušitvijo in postavili stojalo z gelom v hladno sobo.

Slika 4: Stojalo z gelom in vstavljenim glavničkom.

Za izvedbo SDS-PAGE smo si pripravili elektroforezno celico, vanjo pa nalili spodnji pufer in vstavili sendvič z zgornjim pufrom. Nato smo odstranili glavniček ter z zgornjim pufrom s pomočjo Hamiltonove brizge sprali odprtine v koncentracijskem gelu. Gel je bil tako pripravljen za nanos vzorcev. V posamezno odprtino v gelu smo s Hamiltonovo brizgo nanесли 5 μ L označevalca molekulskih mas in 55 μ L ohlajenega vzorca, ki smo ga pripravili iz hrSAA (1,4 μ g SAA/cm gela) (30 μ L), reducirajočega SDS pufra (15 μ L) in PBS pufra (pH 7,4) (10 μ L) ter ga pred nanosom na gel segrevali 5 minut pri temperaturi 95 °C v PCR ciklerju. Reducirajoči SDS pufer vsebuje tudi barvilo bromfenolno modro, ki nam kaže fronto in dodatek glicerola, ki poveča specifično težo vzorca, za lepše usedanje v žepke.

Po nanosu vzorcev in proteinskega standarda smo priključili elektroforezo, ki je potekala približno 1,15 ure pri stalnem toku 12,5 mA in napetosti 125 V za en gel in toku 25,0 mA



in 250 V za dva gela. Med potekom elektroforeze smo si zapisovali dejanske pogoje, pri katerih je tekla elektroforeza. Ko je vzorec pripotoval v ločitveni gel, smo nastavili nove pogoje (napetost 125 V in tok 25,0 mA za en gel ter napetost 250 V in tok 50,0 mA za dva gela) ter si zapisovali dejanske pogoje (slika 5). Ko je bila fronta barvila proti koncu gela (1,5 cm pred koncem gela), smo ustavili elektroforezo in začeli z nadaljnjo obdelavo gela.

Slika 5: Aparatura za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE).

3.2.2 WESTERN PRENOS IN IMUNODETEKCIJA

Po končani SDS-PAGE smo opravili elektroforezen prenos proteinov iz poliakrilamidnega gela na nitrocelulozno (NC) membrano (pivnik) in njihovo imunsko detekcijo. Postopek smo izvajali po osnovnem opisu v referenci 27, ki smo ga nekoliko prilagodili.

Za sam prenos smo si predhodno pripravili NC membrano in filter papir primerne velikosti. V elektroforezno celico smo nalili pufer za elektroforezen prenos (za en prenos potrebujemo 0,8 L) in pazljivo sestavili sendvič tako, da smo najprej položili z blot pufrom dobro omočeno blazinico, nato pa s suhim filter papirjem prenesli gel, na katerega smo položili omočeno NC membrano in omočen filter papir ter pazili, da ni bilo mehurčkov zraka, zato smo previdno povaljali z epruveto. Na tako pripravljen sendvič smo položili še dobro omočeno blazinico ter vse skupaj dobro speli in vstavili v ogrodje elektroforezne kadičke s pufrom za prenos tako, da je gel obrnjen proti negativnemu polu in NC membrana proti pozitivnemu polu. Prenos je potekal 32 minut (0,53 h) pri stalni napetosti 100 V in toku 250 mA. Po končanem prenosu smo razdrli sendvič in na mokri NC membrani s svinčnikom previdno označili spodnjo in zgornjo linijo gela. NC membrano smo položili med dva filter papirja in sušili 10 minut na toplem zraku.

Imunsko detekcijo na pivniku smo izvajali vedno z različnimi serummi bolnikov ter krvodajalcev (naključni izbor). Posušeno NC membrano smo razrezali na 0,4 cm trakce, katere smo inkubirali v 1,5 mL blok pufru (5% mleko v prahu v TBS+0,05% Tween®20) 30 minut na stresalniku in s tem preprečili nespecifično vezavo protiteles na površino membrane, nakar smo NC trakce sprali z destilirano vodo. Na posamezne NC trakce smo

nanesti točno določene serume pacientov ali krvodajalcev, ki so bili redčeni 1:50 z blok pufrom (20 μL seruma in 980 μL blok pufra) in jih inkubirali 2,15 uri na stresalniku pri sobni temperaturi. En trakec je vedno služil kot pozitivna kontrola, na katerega nismo nanesti seruma, ampak le sekundarno protitelo- konjugat anti-SAA iz ELISA kita, označen z AP, redčen v razmerju 1:300 (3,3 μL konjugata in 996,7 μL blok pufra). Trakce smo nato spirali 2 x po 5 minut s TBS + Tween®20 pufrom (pH 7,4) in nato še 2 x po 5 minut z blok pufrom ter 1 x po 5 minut s TBS pufrom (pH 7,4). Sledila je 40 minutna inkubacija NC trakcev v raztopini z encimom označenimi sekundarnimi protitelesi: afinitetno prečiščenimi kozjimi protitelesi, usmerjenimi proti človeškim IgG, konjugiranimi z AP, redčenimi 1:1000 z blok pufrom (za 20 trakcev smo potrebovali 20 μL sekundarnih protiteles in 20 mL pufra). Po inkubaciji smo NC trakce sprali 1 x 5 minut s TBS pufrom (pH 7,4). Nato smo dodali 420 μL substrata 1-Step NBT/BCIP in spremljali toliko časa, da smo zaznali reakcijo (slika 6), približno 5 minut. Na koncu smo trakce sprali z vodo in izsesali vsebino. NC trakce smo položili med dva filter papirja in jih posušili na toplem zraku.



Slika 6: Reakcijska shema kolorimetričnega načina detekcije z AP in substratom NBT/BCIP. Alkalna fosfataza hidrolizira BCIP in tvori intermediat, ki nato dimerizira in proizvaja indigo barvilo. NBT se reducira do NBT-formazana (33).

3.2.3 ENCIMSKO IMUNSKA METODA NA TRDNEM NOSILCU (ELISA)

Protitelesa proti humanemu serumskemu amiloidu A smo določali po nekoliko prirejenem postopku, kot sta ga opisala Rosenau in Schur (14). Iste vzorce serumov krvodajalcev in bolnikov kot pri imunski detekciji na pivniku smo testirali tudi z metodo ELISA.

V vdolbinice obsevanih polistirenskih mikrotiterskih plošč (Costar High Binding 3590 plates) smo nanesti v duplikatih po 50 μL predhodno pripravljenega hrSAA, raztopljenega v PBS pufra (pH 7,4), s končno koncentracijo na plošči 4 mg/L. Tako smo za eno ploščo potrebovali 13,6 μL hrSAA in 3386,4 μL PBS pufra. Plošče smo pokrite inkubirali preko noči pri 4°C v hladni sobi. Po inkubaciji smo vsebino vdolbinic odlili in otreli na

staničevini ter sprali 2x s po 250 μ L PBS+0,1 % Tween®20 (pH 7,4). Nato smo v vsako vdolbinico nanegli po 200 μ L blok pufra, sestavljenega iz 1% BSA v PBS pufri (pH 7,4), in inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi (22-26 °C). Po inkubaciji smo vsebino odlili in vdolbinice sprali 3x s po 250 μ L PBS+0,1% Tween®20 (pH 7,4). Serume pacientov in krvodajalcev ter visoko pozitivno kontrolo, ki je bila v našem primeru serum pacienta, smo dobro premešali na vibracijskem mešalu in jih nato nanegli po 50 μ L v vsako odprtino (z antigenom in brez antigena SAA) ter inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. Te vzorce smo predhodno redčili v razmerju 1:100 (2 μ L in 198 μ L pufra) z 1% BSA–PBS+0,1% Tween®20 pufrom (pH 7,4). Na mesto slepih vzorcev smo nanegli po 50 μ L PBS+0.1% Tween®20 (pH 7,4). Po inkubaciji smo vsebino odlili in vdolbinice 5x sprali s po 250 μ L PBS+0,1% Tween®20 (pH 7,4), nato pa v vsako odprtino nanegli po 50 μ L sekundarnega protitelesa, tj. afinitetno prečiščena kozja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG, konjugirana z AP, redčenega 1:1000 v 1% BSA–PBS+0,1% Tween®20 pufri (pH 7,4). Za celotno ploščico smo tako potrebovali 5 μ L konjugata in 5 mL pufra. Mikrotitersko ploščo smo nato inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vdolbinice sprali 5x z 250 μ L PBS+0,1% Tween®20 (pH 7,4), nato pa v vse vdolbinice odpipetirali 50 μ L kromogenega substrata (končna koncentracija 2 g/L), ki smo ga pripravili 10 minut pred uporabo, in sicer iz 5 mL DEA pufra (pH=9,8) in 2 tabletk p-nitrofenilfosfata (pNPP). Po dodatku kromogenega substrata se je raztopina v vdolbinicah obarvala rumeno (tvorba topnega p-nitrofenola). Absorbanco smo merili spektrofotometrično (Tecan Sunrise) pri 405 nm, dokler nismo dosegli približka absorpcijam izbranega seruma bolnika, ki je predstavljal visoko pozitivno kontrolo (približno 10minut). V MS Excelu smo si naredili lastno predlogo, kamor so se po merjenju izpisale meritve absorbanc v obliki tabele. Potrebna je bila nadaljnja računaska obdelava podatkov. Najprej smo izračunali povprečno absorbanco vzorcev in kontrole ter koeficient variacije, nato pa od povprečne absorbance odšteli absorbanco slepega vzorca ter to pomnožili s koeficientom analize, ki smo ga dobili z aproksimacijo visoko pozitivne kontrole na absorbanco 2,5 (ocenjena absorpcija/izmerjena absorpcija).

3.2.4 DOLOČITEV ANALIZNE SPECIFIČNOSTI WB

Za določitev negativne kontrole smo se odločili, da izpustimo primarno protitelo oziroma serum. Zato smo izvedli le inkubacijo v prisotnosti sekundarnih kozjih protiteles.

Negativno kontrolo brez antigena SAA smo določili tako, da smo iz neuporabljene NC izrezali 4 mm trakec in izvedli imunodetekcijo po postopku za WB, le da smo izpustili korak SDS-PAGE (pred detekcijo nismo ločili SAA). Za primarno protitelo smo izbrali serum bolnika s SLE+APL₇, ki smo ga redčili v razmerju 1:50.

Za določitev pozitivne kontrole smo se odločili, da uporabimo le sekundarno specifično protitelo: konjugat monoklonskih protiteles proti SAA iz ELISA kita, ki so označena z AP in redčena v razmerju 1:300 (3,3 µL konjugata in 996,7 µL blok pufra).

Pred-adsorpcijo protiteles proti SAA pri bolniku z AT₅ smo izvedli tako, da smo isti serum, razredčen v blok pufri v razmerju 1:50 (20 µL seruma in 980 µL blok pufra), prenašali iz trakca na trakec in izvajali imunodetekcijo po stopnjah ter po postopku za WB, opisanem v tem poglavju. Po posamičnih inkubacijah smo nanegli z AP označena kozja protitelesa proti človeškim IgG.

Pri poskusu kompetitivne vezave smo uporabili v prvem primeru serum bolnika z AT (AT₅) redčenega v blok pufri v razmerju 1:100 (10 µL seruma in 990 µL blok pufra), v drugem serum bolnika z AT (AT₅) in zajčja protitelesa proti SAA (donirana od prof. Ernst Malle, Medical University of Graz, poliklonska protitelesa proti SAA- sekvenca 6) v razmerju 1:1 (10 µL seruma+10 µL zajčjih anti-SAA) in v tretjem primeru serum bolnika z AT (AT₅) in zajčja protitelesa proti SAA (Malle pAb#6) v razmerju 1:5 (10 µL seruma+50 µL zajčjih anti-SAA), ter opazovali odzive po imunodetekciji z AP konjugiranimi kozjimi protitelesi proti človeškim IgG.

Celoten postopek IP bolnikovih protiteles proti SAA smo izvajali na ledu in po navodilih proizvajalca, od katerega smo imeli imunoprecipitacijski reagent (Protein A/G Plus-agaroz) (35), ki smo ga nekoliko prilagodili. 10 µL hrSAA (Peprotech, UK) smo inkubirali 1,5 h pri 4°C v prisotnosti 20 µL zajčjih protiteles proti SAA (donirana od prof. Ernst Malle, Medical University of Graz, poliklonska protitelesa proti SAA- sekvenca 6) ter 30 µL PBS pufra (pH 7,4). Nato smo dodali 20 µL resuspendiranega proteina A/G Plus-agaroze in inkubirali 1 uro pri 4°C. Po inkubaciji smo dodali 10 µL seruma bolnika z AT (AT₅) in inkubirali približno 2,45 ure pri 4°C na stresalniku. Sledilo je centrifugiranje s silo 1000xg 5 minut pri 4°C. Supernatant smo odpipetirali v epruveto, preostalo usedlino

pa smo sprali 2-4x z 0,5 mL PBS pufrom (pH 7,4) in med vsakim spiranjem ponovili centrifugiranje. Prvi supernatant smo shranili, vse ostale pa zavrgli. Po IP smo izvedli imunodetekcijo s supernatantom po postopku za WB.

Metodo SDS-PAGE v prisotnosti 6M raztopine sečnine smo izvedli po postopku, opisanem v tem poglavju, s določenimi spremembami, opisanimi v referenci 28. Pred SDS-PAGE smo reducirajočem vzorcu (5 μ L) dodali poleg hrSAA (3,78 μ g) toliko 12 M raztopine sečnine (11,2 μ L), da je bila končna koncentracija v vzorcu 6 M. Poleg vzorca pa smo dodali 12 M raztopino sečnine tudi v ločitveni (1,2 g) in koncentracijski gel (0,84 g), tako da je bila končna koncentracija v gelu 6 M. Nato pa smo tako pripravljen vzorec nanесли na pripravljen gel iz 6 M sečnine. Po končani elektroforezi smo izvedli prenos na NC membrano in imunodetekcijo po postopku za WB, opisanem v tem poglavju.

3.2.5 DOLOČITEV LINEARNOSTI MERITVE KONCENTRACIJE SAA Z WB

Za ugotavljanje linearnosti metode smo si pripravili vzorce z različnimi koncentracijami hrSAA, in sicer: 1,4 μ g/cm, 2,7 μ g/cm in 5,3 μ g/cm gela, ki smo jim dodali ustrezno količino reducirajočega SDS pufra in PBS pufra (pH=7.4). Tako pripravljene vzorce smo nanесли s Hamiltonovo brizgo na predhodno pripravljen poliakrilamidni gel in izvedli elektroforezo. Po končani elektroforezi smo prenesli proteine na NC membrano, za detekcijo pa smo uporabili le z AP konjugirana monoklonska protitelesa proti SAA iz ELISA kita, redčena v razmerju 1:300 (3,3 μ L konjugata in 996,7 μ L blok pufra).

3.2.6 DOLOČITEV ANALIZNE SPECIFIČNOSTI METODE ELISA

Pred vsakim začetkom izvedbe ELISA smo na obsevano polistirensko mikrotitersko ploščico namesto hrSAA nanесли 50 μ L PBS pufra (pH 7,4) v vsak tretji stolpec ploščice (t.i. »vzorčna slepa ali sample blank«). Ploščice smo pokrite inkubirali preko noči pri 4°C v hladni sobi. Naslednji dan pa smo izvedli imunodetekcijo po postopku za anti-SAA ELISA. Odziv te vdolbinice vzorca dejansko pomeni prispevek SAA h končni absorbanci.

Pred-adsorpcijo protiteles proti SAA pri pacientu z AT (AT₅) smo izvedli tako, da smo isti serum, razredčen v 1% BSA-PBS+0,1% Tween®20 pufru v razmerju 1:100 (4 μ L seruma in 396 μ L pufra), prenašali iz luknjice v luknjico ploščice, katere površina je bila prekrita z

antigenom SAA v končni koncentraciji na plošči 4 mg/L. Imunodetekcijo smo izvedli po stopnjah ter po postopku anti-SAA ELISA.

Pri poskusu redčitve seruma smo serum bolnika z AT (AT₅) redčili v 1% BSA-PBS+0,1% Tween® 20 pufri v treh različnih razmerjih: 1:100 (2 µL seruma in 198 µL pufra), 1:200 (1 µL seruma in 199 µL pufra) in 1:400 (0,5 µL seruma in 199,5 µL pufra), ter opazovali odzive po imunodetekciji.

Pri poskusu kompeticije smo uporabili v prvem primeru serum bolnika z AT (AT₅) redčenega v 1% BSA-PBS+0,1% Tween pufri v razmerju 1:100 (2 µL seruma+ 198 µL pufra), v drugem serum bolnika z AT (AT₅) in zajčja protitelesa proti SAA (donirana-Prof. Ernst Malle, Medical University of Graz, poliklonska protitelesa proti SAA- sekvenca 5 in 6) v razmerju 1:1 (2 µL seruma in 2 µL zajčjih anti-SAA) in v tretjem primeru serum bolnika z AT (AT₅) in zajčja protitelesa proti SAA (donirana-Prof. Ernst Malle, Medical University of Graz, poliklonska protitelesa proti SAA- sekvenca 5 in 6) v razmerju 1:5 (2 µL seruma in 10 µL zajčjih anti-SAA), ter opazovali odzive po imunodetekciji.

Celoten postopek IP smo izvajali na ledu ter na stresalniku v hladni sobi in po navodilih proizvajalca imunoprecipitacijskega reagenta (Protein A/G Plus- agaroz) (35), ki smo ga nekoliko prilagodili. Z IP smo ugotavljali specifičnost odziva tako, da smo prvič imunoprecipitali hrSAA, drugič pa bolnikova protitelesa proti SAA in spremljali odzive.

- 1 µL hrSAA (Peprotech, UK) smo inkubirali 1,5 h pri 4°C v prisotnosti 3 µL zajčjih protiteles proti SAA (donirana-Prof. Ernst Malle, Medical University of Graz, poliklonska protitelesa proti SAA- sekvenca 5 in 6) v 100 µL PBS pufra (pH 7,4). Nato smo dodali 5 µL resuspendiranega proteina A/G Plus- agaroze in inkubirali 1 uro pri 4°C. Po inkubaciji je sledilo centrifugiranje s silo 1000xg 5 minut pri 4°C. Supernatant smo odpipetirali v epruveto, preostalo usedlino pa smo sprali 2-4x s 0,5 mL PBS pufrom (pH 7,4) in med vsakim spiranjem ponovili centrifugiranje. Prvi supernatant smo shranili, vse ostale pa zavrgli. Volumen supernatanta (220 µL), ki ustreza koncentraciji SAA 4 mg/L na plošči, smo nanegli na mikrotitersko ploščico za izvedbo anti-SAA ELISA, in inkubirali preko noči pri 4°C. Naslednji dan pa smo izvedli detekcijo s serumom bolnika z AT (AT₅).
- 1 µL hrSAA (Peprotech, UK) smo inkubirali 1,5 h pri 4°C v prisotnosti 3 µL zajčjih protiteles proti SAA (donirana-Prof. Ernst Malle, Medical University of Graz,

°C. Po inkubaciji smo dodali 1 μ L seruma pacienta z AT (AT₅) in inkubirali približno 2,45 ure pri 4°C. Nato je sledilo centrifugiranje s silo 1000xg 5 minut pri 4°C. Supernatant smo odpipetirali v epruveto, preostalo usedlino pa smo sprali 2-4x s 0,5 mL PBS pufrom (pH 7,4) in med vsakim spiranjem ponovili centrifugiranje. Prvi supernatant smo shranili, vse ostale pa zavrgli. Po izvedbi IP smo nanesti supernatant na ELISA ploščico, prekrito s hrSAA (PeproTech, UK) v končni koncentraciji na plošči 4 mg/L, in izvedli imunodetekcijo po postopku za ELISA.

3.2.7 DOLOČITEV LINEARNOSTI MERITVE KONCENTRACIJE SAA Z anti-SAA ELISA

Za ugotavljanje linearnosti metode smo si pripravili mikrotitersko ploščo z vezanim hrSAA v različnih koncentracijah, in sicer: 0, 0.5, 1, 2, 4 in 8 mg/L. Za izvedbo imunodetekcije po postopku za anti-SAA ELISA, opisanem v tem poglavju, pa smo uporabili poleg pozitivne kontrole ter slepega vzorca, tudi serume bolnikov in zdravih krvodajalcev.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Prisotnost avtoprotiteles proti lastnim antigenom je lahko povezana s posebnimi kliničnimi stanji in bolezenskimi znaki, za katere je možno, da so avtoimunsko pogojeni. Zgodnje odkrivanje in ustrezna klinična razlaga prisotnosti avtoprotiteles lahko prispevajo k zgodnjemu zdravljenju in omogočajo ustrežnejše zasledovanje poteka bolezni in oceno odziva organizma na zdravila. Protitelesa proti SAA predstavljajo novo skupino avtoprotiteles, ki so jih prvič opisali leta 2004 pri bolnikih s SLE, globoko VT in nekaterih drugih vnetnih avtoimunskih boleznih. Zaradi malih skupin do sedaj in splošnega pomanjkanja podatkov o prisotnosti avtoprotiteles proti SAA v humanih serumih smo se odločili, da se osredotočimo na dve glavni skupini bolnikov: avtoimunska skupina [sistemski lupus eritematozus (SLE), sistemski lupus eritematozus z antifosfolipidnimi protitelesi (SLE+aPL), primarni antifosfolipidni sindrom (PAPS) in sekundarni antifosfolipidni sindrom (SAPS)] ter trombotična skupina [venska tromboza (VT) in arterijska tromboza (AT)]; in ju primerjamo z zdravimi krvodajalci. Pri vseh serumskih vzorcih, razen pri normalah N1, smo imeli na voljo že podatke o antigenu SAA (7). Za detekcijo avtoprotiteles proti SAA smo uporabili metodi SDS-PAGE in Western prenosa, pri kateri smo zaznali prisotnost le-teh, zato smo želeli potrditi rezultate in določiti vrednosti še z encimsko imunsko metodo na trdnem nosilcu (ELISA).

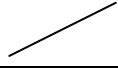
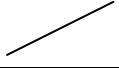
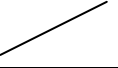
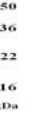



4.1 DETEKCIJA PROTITELES PROTI SAA NA NITROCELULOZNI MEMBRANI PO SDS-PAGE IN WB

S SDS-PAGE/WB smo ugotavljali prisotnost oziroma odsotnost avtoprotiteles proti SAA v serumih zdravih krvodajalcev (n=78) in primerjali le-te z nivoji v serumih bolnikov z avtoimunskimi boleznimi (n=36) in trombozami (n=42). V nadaljevanju pa smo metodo Western prenosa tudi ustrezno ovrednotili s pomočjo analize specifičnosti ter linearnosti meritve koncentracije SAA.

4.1.1 PRIKAZ ANALIZNE SPECIFIČNOSTI WB

Pri nobeni od negativnih kontrol (slika 7) bodisi v odsotnosti bodisi prisotnosti seruma bolnika nismo zaznali odziva, iz česar lahko sklepamo, da se tudi z AP označena kozja

protitelesa proti človeškim IgG niso lepila oz. nespecifično vezala na antigen SAA. Pri pozitivni kontroli (katero smo nanegli pri vsaki izvedbi) smo z uporabo sekundarnih mAb proti SAA iz ELISA kita, ki se vežejo na specifičen epitop na SAA, zaznali močnejšo liso pri monomerni obliki in zelo šibko liso pri dimerni obliki SAA z zelo čistim ozadjem (slika 7), pri tem pa nam je služila kot orientacija pri določitvi pozitivnosti.

	NEGATIVNA KONTROLA	NEGATIVNA KONTROLA	POZITIVNA KONTROLA
SAA Peptotech	1,4 µg/cm		1,4 µg/cm
Primarno protitelo		<i>SLE+aPL₇</i>	
Sekundarno protitelo	Kozja anti-human IgG*AP		Konjugat mAb antiSAA*AP iz ELISA
			

Slika 7: Odzivi pri kontrolah po SDS-PAGE/WB (*SLE+aPL₇*- serum bolnika s sistemskim lupusom eritematozusom in antifosfolipidnimi protitelesi (številka seruma: 7), mAb-monoklonsko protitelo, AP- alkalna fosfataza).

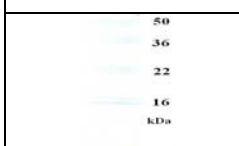



Pri poskusu pred-adsorpcije smo isti serum bolnika z AT (AT₅) prenašali iz trakca na trakec in izvajali detekcijo po stopnjah. Za izbiro seruma smo se odločili na podlagi predhodne detekcije, pri kateri se je izkazalo, da daje močan odziv. Pri izvedbi poskusa nam je intenziteta lis slabila, kar smo pričakovali, saj je v vsaki reakciji manj protiteles proti SAA za vezavo na antigen SAA (izpraznitev seruma) (slika 8).

Antigen	SAA Peptotech (1,4 µg/cm)		
Primarno protitelo	<i>AT₅</i>	<i>AT₅</i>	<i>AT₅</i>
Sekundarno protitelo	Kozja anti-human IgG*AP		
Substrat	1-Step™ NBT/BCIP		



Slika 8: Odzivi po detekciji protiteles proti SAA bolnika, katerega serum smo prenašali (*AT₅- serum bolnika z arterijsko trombozo (številka seruma: 5), AP- alkalna fosfataza*).


Pri poskusu kompeticije smo pri serumu, ki je bil redčen 1:100, zaznali zelo močno liso pri monomerni obliki SAA in precej manj pri dimerni obliki SAA (slika 9). Pri detekciji vzorca iz seruma in zajčjih protiteles proti SAA v razmerju 1:1 nismo opazili bistvenega zmanjšanja odziva (slika 9), verjetno zaradi prenizke koncentracije zajčjih protiteles proti SAA, ki tekmujejo z bolnikovimi protitelesi proti SAA za vezavna mesta na SAA. Pri detekciji vzorca iz seruma in zajčjih protiteles proti SAA v razmerju 1:5 pa smo opazili le delno zmanjšanje širine lis v primerjavi s trakcem 2 (slika 9), kar nakazuje na to, da verjetno zajčja protitelesa proti SAA (Malle pAb#6) križno reagirajo z AP konjugiranimi kozjimi protitelesi proti človeškim IgG, zaradi česar nismo dobili zmanjšane odziva, ki bi ga sicer pričakovali pri takšnem razmerju. Posamezne razlike med lisami na traktih smo skušali tudi denzitometrično določiti, a nam zaradi prevelike ukrivljenosti lis ni uspelo.

Antigen	SAA Peprotech (1,4 µg/cm)		
Primarno protitelo	<i>AT₅</i>	<i>AT₅ + Zajčja aSAA 1:1</i>	<i>AT₅ + Zajčja aSAA 1:5</i>
Sekundarno protitelo	Kozja anti-human IgG* AP		
Substrat	1-Step™ NBT/BCIP		
			

Slika 9: Odzivi po imunodetekciji protiteles proti SAA pri bolniku z AT in po njihovem tekmovanju z zajčjimi anti-SAA protitelesi (Malle pAb#6) v razmerju 1:1 ter 1:5 (*aSAA-protitelesa proti SAA, AT₅- serum bolnika z arterijsko trombozo (številka seruma: 5), AP-alkalna fosfataza*).

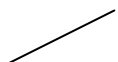

Pri imunodetekciji supernatanta po imunoprecipitaciji (IP) bolnikovih protiteles proti SAA nismo dobili odziva (slika 10), kar pomeni, da je IP uspela in, da smo pobrali iz vzorca vsa

zajčja poliklonska protitelesa proti SAA (Malle pAb #6) kot tudi bolnikova protitelesa proti SAA. Poleg tega pa smo potrdili, da ni prišlo do odlepljanja protiteles proti SAA, ki so že bila vezana v kompleks, zaradi česar bi lahko dobili lažno pozitiven rezultat.

Antigen	SAA Peprotech (1,4 µg/cm)	
Primarno protitelo	<i>AT₅</i>	<i>AT₅ po IP</i>
Sekundarno protitelo	Kozja anti-human IgG* AP	
Substrat	1-Step™ NBT/BCIP	
		

Slika 10: Odzivi pri bolniku z AT in bolniku z AT po IP na WB (*AT₅- serum bolnika z arterijsko trombozo (številka seruma: 5), IP-imunoprecipitacija, AP- alkalna fosfataza*).

Pri metodi SDS-PAGE v prisotnosti 6M raztopine sečnine smo se z namenom potrditve študije Wanga in Colona (36) o disociaciji oligomernih v monomerno obliko SAA odločili, da uporabimo v našem poskusu najvišjo omenjeno koncentracijo sečnine, torej 6M, ki je priporočena tudi s strani literature (6-8M) (28). Za ta namen smo pred SDS-PAGE dodali vzorcu, ločitvenemu in koncentracijskemu gelu toliko 12M raztopine sečnine, da je bila končna koncentracija v vzorcu in gelu 6M. Za izbiro vzorcev smo se odločili na podlagi predhodnih detekcij (slika 11, trakci 1-4), in izbrali tri serume bolnikov, ki so dajali odzive tudi na di-, tri- in tetramerno obliko SAA, poleg teh pa smo testirali tudi pozitivno kontrolo (brez primarnega protitelesa). Po detekciji s sekundarnimi protitelesi smo pri vseh vzorcih, po obdelavi s 6M raztopino sečnine, dobili lise na WB le pri monomerni obliki SAA, brez vmesnih oligomernih oblik SAA (slika 11, trakci 5-8). S tem smo potrdili rezultate, ki so jih predstavili v študiji na mišjem SAA, tudi na človeškem SAA, hkrati pa tudi specifičnost vezave protitelesi proti SAA na SAA.

Antigen	1) SAA Peprotech (1,4 µg/cm)			2) SAA Peprotech (1,4 µg/cm) + 6M UREA				
Primarno protitelo		<i>SLE+</i> <i>aPL₇</i>	<i>AT₇</i>	<i>SAPS₇</i>		<i>SLE+</i> <i>aPL₇</i>	<i>AT₇</i>	<i>SAPS₇</i>

Sekundarno protitelo	Konjugat mAb antiSAA*AP iz ELISA	Kozja anti-human IgG*AP	Konjugat mAb antiSAA*AP iz ELISA	Kozja anti-human IgG*AP
Substrat	1-Step™ NBT/BCIP			

Slika 11: Odzivi detekcije protiteles proti SAA z WB po SDS-PAGE v prisotnosti 1) antigena SAA in 2) antigena SAA in 6M raztopine sečnine (*SLE+aPL7- serum bolnika s sistemskim lupusom eritematozusom in antifosfolipidnimi protitelesi (številka seruma: 7), AT7- serum bolnika z arterijsko trombozo (številka seruma: 7), SAPS7- serum bolnika s sekundarnim antifosfolipidnim sindromom (številka seruma: 7), AP- alkalna fosfataza*).

V študiji Wang in Colona (36) so proučevali stabilnost nativnega mišjega SAA2.2 (v vodnem okolju tvori heksamer s centralnim kanalom (37)) z različnimi biokemičnimi in biofizikalnimi metodami za določitev strukturnih sprememb po denaturaciji s sečnino. Pri tej študiji so inkubirali SAA z različnimi koncentracijami sečnine (0,5M- 6,0M), pri čemer je sečnina povzročila disociacijo heksamernih oblik SAA do monomerne oblike SAA brez vmesnih populacij dimernih in trimernih oblik SAA. Nativni heksamerni SAA2.2 vsebuje ~50% α -heliksov in ~10% β -strukture, ki pri ~2M raztopini sečnine izgubi večino native strukture, zato predvidevajo, da ima oligomerizacija in s tem vzpostavitev hidrofobnih vezi v SAA2.2 pomembno vlogo pri stabilizaciji njegove sekundarne in terciarne strukture *in vivo*. Na podlagi opažanj, da se lahko le monomerna oblika SAA2.2 veže na HDL delce *in vitro* so predlagali, da je pri oligomerizaciji SAA2.2 vpleten N-terminalni del molekule, zaradi česar predvidevajo, da HDL vezoči N-terminalni del SAA2.2 ni dostopen za vezavo znotraj heksamera. Ugotovili so tudi, da vsebuje centralni fragment SAA2.2 39-86 AK ostanek, ki ne heksamerizira. To kaže na dejstvo, da je heksamerni SAA2.2 marginalno stabilen protein, ki uravnava svoje funkcije z enostavnim preklapljanjem med različnimi oligomernimi oblikami SAA; npr. visoka koncentracija SAA med vnetjem ali vezava različnih ligandov lahko stabilizira heksamerno obliko SAA, in s tem služi kot regulatorni mehanizem pri normalnih fizioloških aktivnostih kot tudi pri aktivaciji imunskega sistema med akutno faznim odzivom. Zato se zdi, da ima monomerni SAA tudi pri fizioloških pogojih (37°C) strukturne lastnosti podobne »nativno razvitim« proteinom, ki so lahko pomembni za funkcije medmolekulske prepoznavne, kot je oligomerizacija in vezava

različnih ligandov (HDL, Ca^{2+} , integrinske in fibronektinske molekule ter heparin/heparan sulfat) (36).

4.1.2 LINEARNOST MERITVE KONCENTRACIJE SAA Z WB

Pri tem poskusu nas je zanimalo, ali se s povečano koncentracijo antigena SAA povečuje tudi odziv na WB. Pri koncentraciji SAA (1,4 $\mu\text{g}/\text{cm}$), ki smo ga nanašali tudi za detekcijo pri vzorcih, smo dobili močnejšo liso pri monomerni obliki SAA in zelo šibko liso pri dimerni obliki SAA (slika 12). Pri dvakrat večji koncentraciji SAA (2,7 $\mu\text{g}/\text{cm}$) na membrani se je odziv skoraj dvakrat povečal, pri čemer smo sedaj opazili poleg močne monomerne lise tudi močnejše izraženo liso pri dimerni obliki SAA (slika 12). Pri koncentraciji SAA 5,3 $\mu\text{g}/\text{cm}$ membrane pa smo opazili rahlo povečanje odziva, saj se je lisa pri monomerni obliki SAA razširila, intenziteta lise pri dimerni obliki SAA pa se je ojačala (slika 12), s čimer smo prikazali trend naraščanja odziva po detekciji.

SAA Peprotech	1,4 $\mu\text{g}/\text{cm}$	2,7 $\mu\text{g}/\text{cm}$	5,3 $\mu\text{g}/\text{cm}$
Primarno protitelo			
Sekundarno protitelo	Konjugat mAb antiSAA*AP iz ELISA (1:300)		
Substrat	1-Step™ NBT/BCIP		

Slika 12: Prikaz vpliva naraščajoče koncentracije antigena SAA na odziv po detekciji (*mAb*- monoklonsko protitelo, *AP*- alkalna fosfataza).

4.1.3 PRIKAZ REZULTATOV PO WESTERN PRENOSU IN KOLORIMETRIČNI DETEKCIJI

Po ločitvi hrSAA (Peprotech, UK) s SDS-PAGE po postopku 1 ter prenosu na nitrocelulozno membrano in kolorimetrični detekciji po postopku 2 (opisanem v poglavju Materiali in metode) smo dobili rezultate, ki so prikazani v spodnjih tabelah za vsako skupino posebej. Zaradi pomanjkanja referenčnih standardov smo pri vsaki imunodetekciji nanegli na membrano pozitivno kontrolo (brez primarnega protitelesa). Pri vseh vzorcih





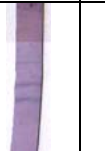





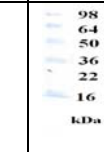
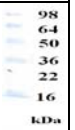
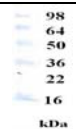
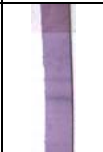


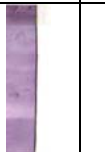




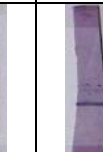

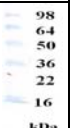
smo zasledili največjo imunoreaktivnost pri lisah na trakeh, ki pripadajo molekulskim masam pri 12 kDa (monomer) in 24 kDa (dimer), pri nekaterih vzorcih pa tudi šibke nejasne lise pri okrog 37 kDa (trimerna oblika SAA) in 50 kDa (tetramerna oblika SAA), kot so tudi poročali Malle in sodelavci (38), kateri so tudi prikazali, da se isti vzorec monomer-dimer pojavlja, kadar so ločili SAA pod nedenaturirajočimi pogoji s PAGE.

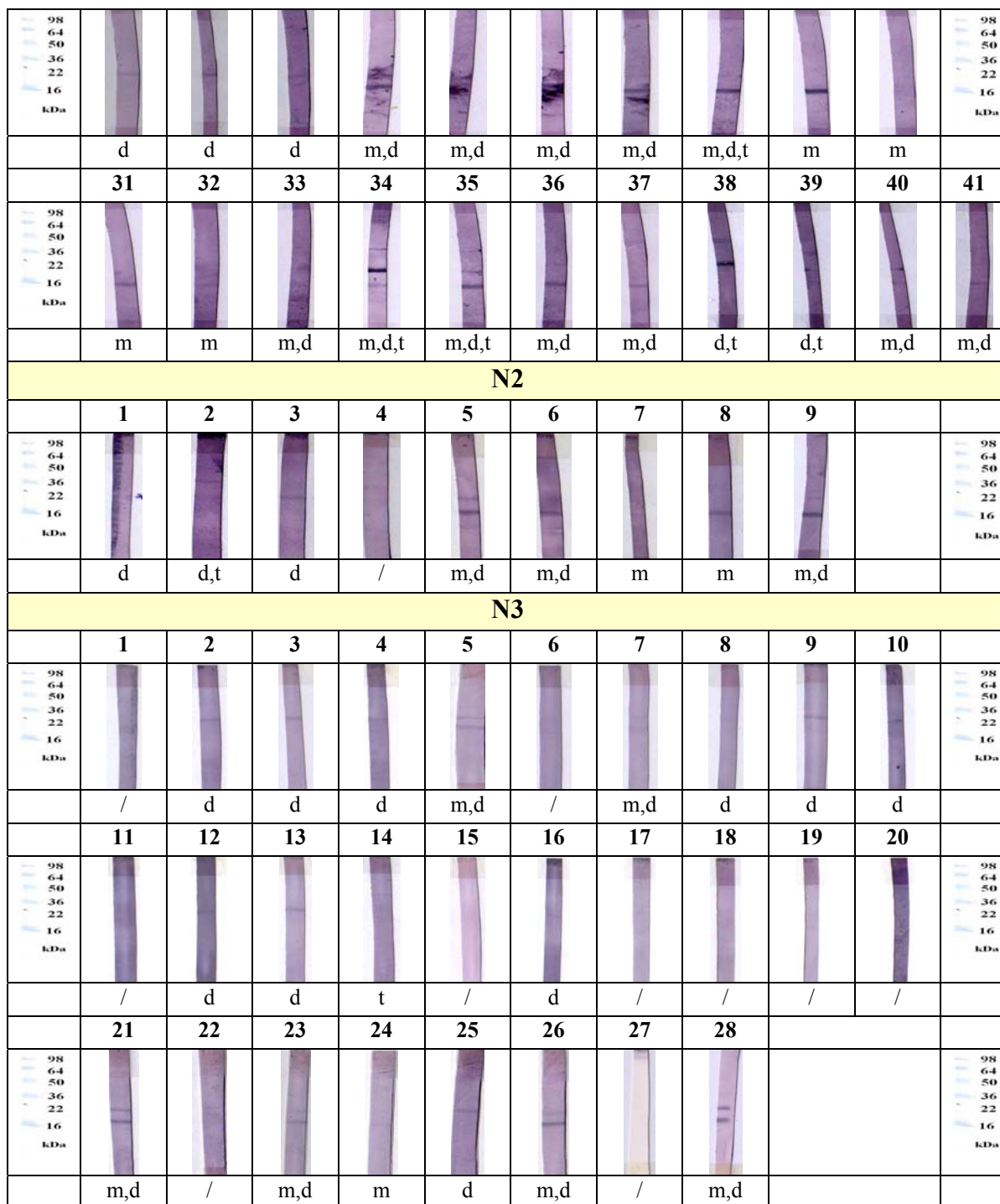
4.1.3.1 Zdravi krvodajalci

Od 41 serumov normal N1 smo le pri enem zaznali negativen rezultat z zelo čistim ozadjem (slika 13, trakec 9). Pri pozitivnih vzorcih pa smo v največji meri zaznali protitelesa proti mono+dimerni obliki SAA, nato pa proti sami dimerni obliki SAA. Protitelesa usmerjena proti različnim večmernim ter proti monomerni obliki SAA pa so zastopana v približno enakem razmerju, vendar glede na celoto jih je relativno malo.

Od 9 serumov normal N2 smo le pri enem zaznali negativen rezultat z zelo čistim ozadjem (slika 13, trakec 4), pri pozitivnih vzorcih pa v največji meri protitelesa proti mono+dimerni obliki SAA, nato pa v enakem razmerju proti monomerni ter dimerni obliki SAA.

Od 28 serumov normal N3 smo pri desetih določili negativen rezultat z zelo čistim ozadjem (slika 13, trakec 1, 6, 11, 15, 17, 18, 19, 20, 22 in 27). Pri pozitivnih vzorcih pa smo zaznali predvsem protitelesa, ki so usmerjena proti dimerni obliki SAA, nato pa proti mono+dimerni obliki SAA. Protitelesa proti monomerni (slika 13, trakec 24) ter večmerni obliki SAA (slika 13, trakec 14) pa smo zaznali po en primer.

N1											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
											
	m,d	m,d	d,t	m,d,t	m,d	m,d	m,d	m,d	/	m,d	
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
											
	m,d	d,t	m,d	d,t	m,t,tet	d	d	d	m,d	m,d	
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	

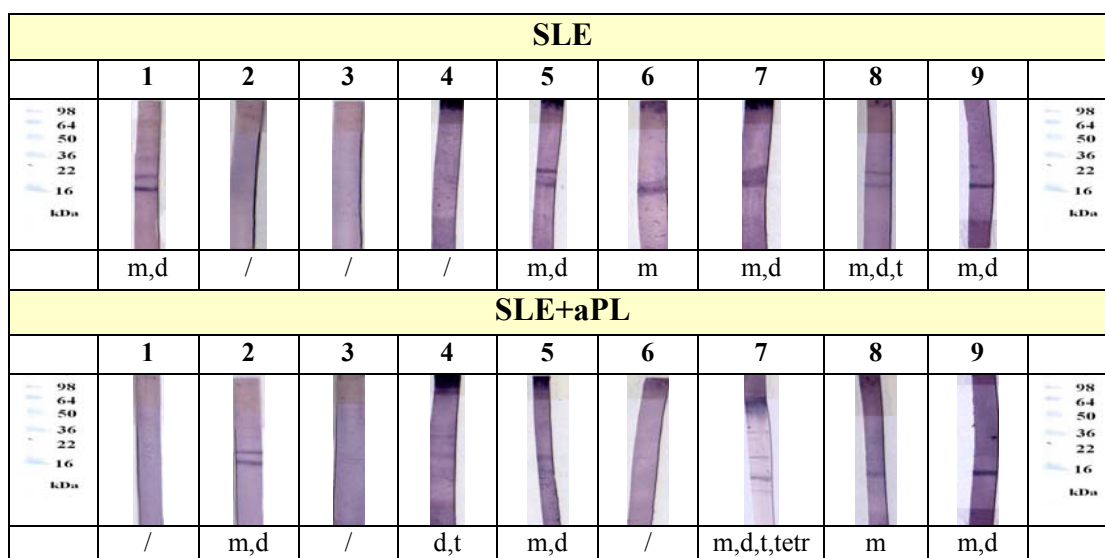


Slika 13: Prikaz prisotnosti oz. odsotnosti protiteles proti SAA pri zdravih krvodajalcih (*m*-monomerna, *d*- dimerna, *t*- trimerna, *tetr*- tetramerna oblika SAA).

4.1.3.2 Bolniki z avtoimunskimi boleznimi

Od 9 serumov bolnikov s SLE in 9 serumov bolnikov s SLE+aPL smo pri treh vzorcih v vsaki skupini zaznali negativen rezultat z zelo čistim ozadjem (slika 14, trakec 2, 3 in 4 ter trakec 1, 3 in 6). V pozitivnih serumih bolnikov s SLE smo določili predvsem protitelesa,

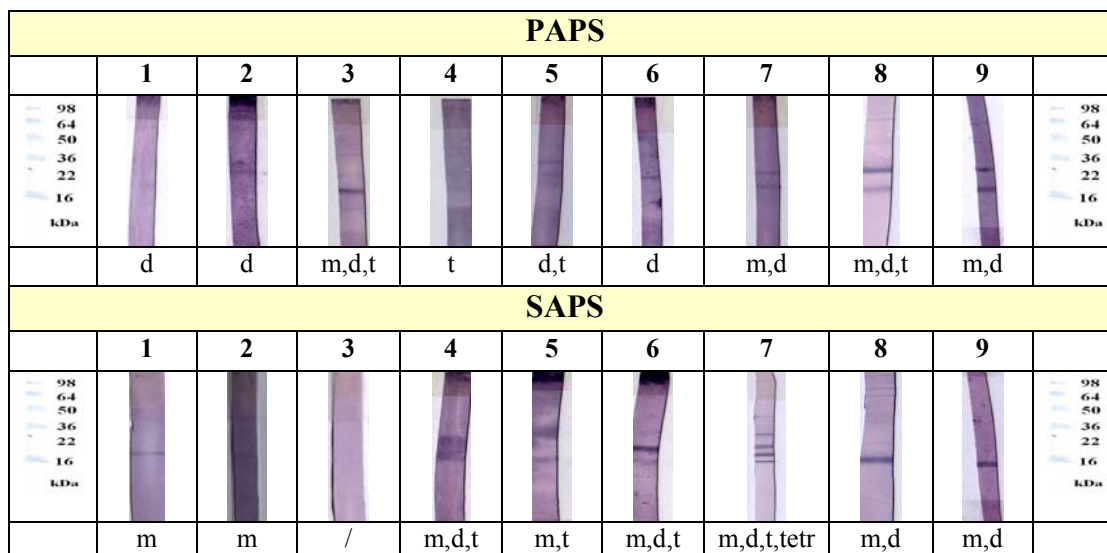
ki so usmerjena proti mono+dimerni obliki SAA, medtem ko smo pri enem vzorcu zaznali protitelesa proti monomerni obliki SAA (slika 14, trakec 6) in enem proti večmerni obliki SAA (slika 14, trakec 8). Z razliko od normal N1 pa smo pri bolnikih s SLE kot tudi SLE+aPL določili odsotnost protiteles proti dimerni obliki SAA. V pozitivnih serumih bolnikov s SLE+aPL pa smo določili predvsem protitelesa, ki so usmerjena proti mono+dimerni obliki SAA. Z razliko od bolnikov s SLE pa smo pri teh bolnikih določili več protiteles, ki so usmerjena proti različnim večmernim oblikam SAA.



Slika 14: Prikaz prisotnosti oz. odsotnosti protiteles proti SAA pri 9 bolnikih s SLE ter 9 bolnikih s SLE+aPL (*m*- monomerna, *d*- dimerna, *t*- trimerna, *tetr*- tetramerna oblika SAA).

Vseh 9 serumov bolnikov s PAPS je pozitivnih, v katerih smo določili predvsem protitelesa, ki so usmerjena proti dimerni obliki SAA, sledijo pa protitelesa proti različnim večmernim oblikam SAA. Z razliko od normal N1 pa smo pri teh bolnikih določili prisotnost protiteles, ki so usmerjena proti mono+dimerni obliki SAA, le v dveh serumih (slika 15, trakec 7 in 9), ter odsotnost protiteles proti monomerni obliki SAA.

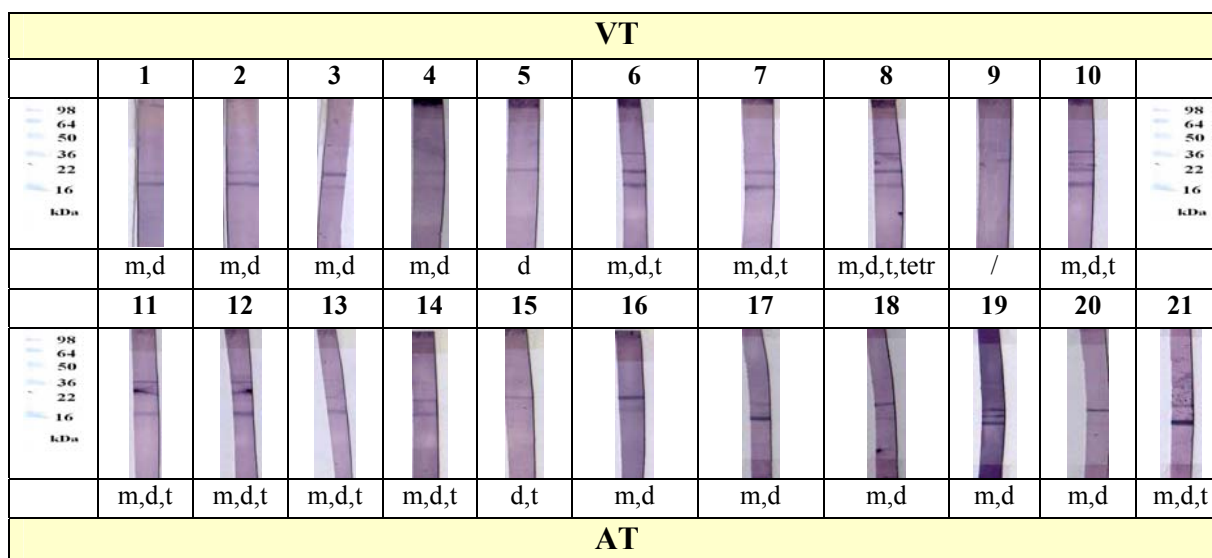
Od 9 serumov bolnikov s SAPS smo le pri enem zaznali negativen rezultat z relativno čistim ozadjem (slika 15, trakec 3). V pozitivnih serumih pa smo določili predvsem protitelesa proti različnim večmernim oblikam SAA, sledijo pa v enakem razmerju protitelesa proti monomerni ter mono+dimerni obliki SAA. Z razliko od bolnikov s PAPS in normal N1, pa smo pri teh bolnikih določili odsotnost protiteles proti dimerom SAA.

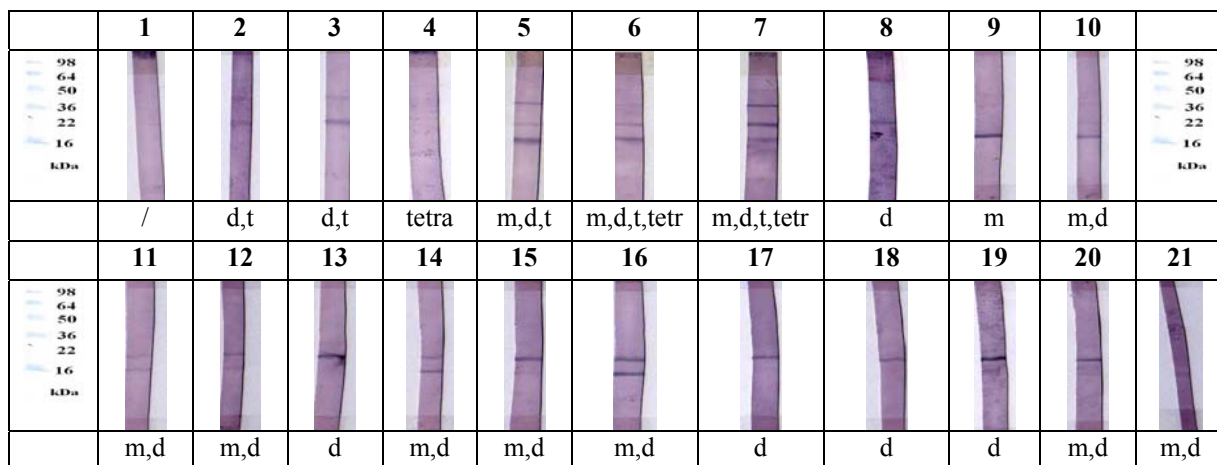


Slika 15: Prikaz prisotnosti oz. odsotnosti protiteles proti SAA pri 9 bolnikih s PAPS ter 9 bolnikih s SAPS (*m*- monomerna, *d*- dimerna, *t*- trimerna, *tetr*- tetramerna oblika SAA).

4.1.3.3 Bolniki s trombozami

Od 21 bolnikov z VT in 21 bolnikov z AT smo le pri enem vzorcu pri vsaki skupini zaznali negativen rezultat z relativno čistim ozadjem (slika 16, trakec 9 in 1). V pozitivnih serumih bolnikov z VT smo določili v enakem razmerju prisotnost protiteles, ki so usmerjena proti mono+dimerni obliki ter proti mono+di+večmerni obliki SAA. V pozitivnih serumih bolnikov z AT pa smo določili predvsem protitelesa, ki so usmerjena proti mono+dimerni obliki SAA, sledijo pa protitelesa proti dimerni obliki SAA. Z razliko od bolnikov z VT pa smo pri teh bolnikih določili prisotnost protiteles, ki so usmerjena proti večmernim oblikam SAA, v približno enakem razmerju kot pri normalah N1.





Slika 16: Prikaz prisotnosti oz. odsotnosti protiteles proti SAA pri 21 bolnikih s VT ter 21 bolnikih z AT (*m- monomerna, d- dimerna, t- trimerna, tetr- tetramerna oblika SAA*).

4.1.4 PRIKAZ OBDELAVE REZULTATOV

S SDS-PAGE/WB smo določili prisotnost protiteles proti SAA v najvišjem deležu pri normalah N1 (97,6%) in pri skupini bolnikov s trombozami (95,2%) (tabela 1). Najvišji delež negativnih (19,4%) smo določili v avtoimunske skupini. Znotraj avtoimunske skupine smo zaznali najvišjo navzočnost protiteles proti SAA pri PAPS (100%), nato SAPS (88,9%) in v enakem deležu (66,7%) pri SLE in SLE+aPL, medtem, ko smo pri trombotični skupini (AT in VT) določili enak delež (95,2%) (tabela 1). Pri skupinah normal pa smo ugotovili, da pozitivnost na protitelesa proti SAA upada s shranjevanjem vzorcev (tabela 1).

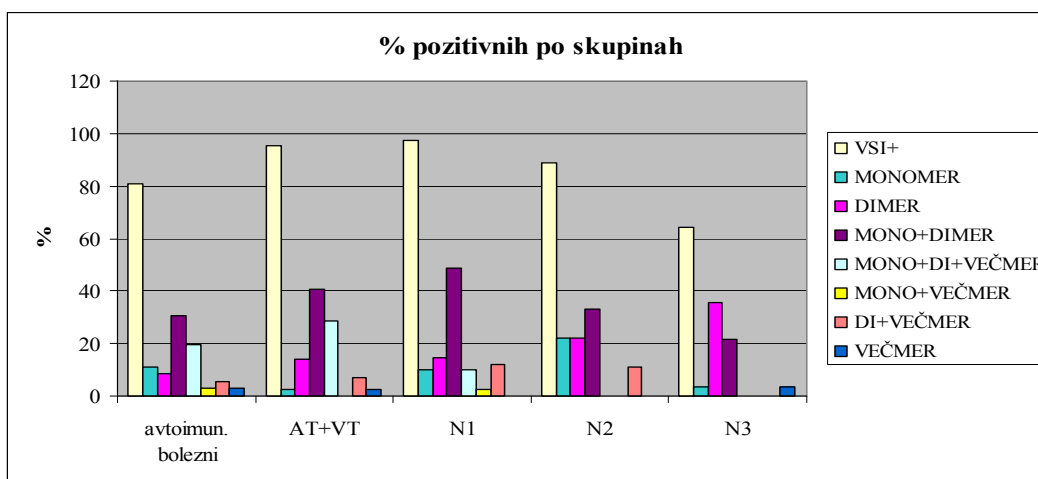
Tabela 1: Prikaz prisotnosti (številčno in %) protiteles proti SAA po skupinah, ki smo jih določili s SDS-PAGE/WB (*SLE- sistemski lupus eritematozus, SLE+aPL- sistemski lupus eritematozus z antifosfolipidnimi protitelesi, PAPS in SAPS - primarni in sekundarni antifosfolipidni sindrom, AT- arterijska tromboza, VT- venska tromboza*).

Diagnoza	Število pozitivnih/vsi	%
Sistemske avtoimunske bolezni	29/36	80,6
	SLE 6/9	
	SLE+aPL 6/9	
	PAPS 9/9	
	SAPS 8/9	

AT+VT	40/42 AT 20/21 VT 20/21	95,2
Zdravi krvodajalci:		
N1	40/41	97,6
N2	8/9	88,9
N3	18/28	64,3

V vzorcih vseh skupin (zdravi krvodajalci, trombotični bolniki in bolniki z avtoimunskimi boleznimi) prevladujejo protitelesa, ki prepoznavajo mono+dimerno obliko SAA (slika 17), med katerimi smo določili najvišji % pri normalah N1 (48,8%), ter nato pri skupini trombotičnih bolnikov (42,5%) (slika 17), najnižji delež pozitivnih, če izključimo normale N3 (21,4%), pa smo določili pri avtoimunski skupini (30,6%) (slika 17), kar korelira z določitvijo pozitivnosti po skupinah. Skupina trombotičnih bolnikov je po pozitivnosti na protitelesa proti dimerni obliki SAA (14,3%) podobna normalam N1 (14,6%) (slika 17). Najnižji % pozitivnih proti dimerni obliki pa smo določili pri avtoimunski skupini (8,3%) (slika 17). Medtem, ko smo protitelesa, ki prepoznavajo monomerno obliko SAA, zaznali v približno enakem deležu pri normalah N1 (9,8%) ter pri avtoimunski skupini (11,1%) (slika 17), če seveda izključimo normale N2 (22,2%), v zelo majhnem obsegu (2,4%) pa pri skupini trombotičnih bolnikov (slika 17). 25% vzorcev vseh skupin je reagiralo tudi z različnimi populacijami večmernih oblik SAA. Najvišji delež protiteles, ki prepoznavajo mono+di+večmerno obliko SAA, smo določili pri skupini trombotičnih bolnikov (28,6%), ki je podobna avtoimunski skupini (19,4%), če izključimo negativne (slika 17). Medtem, ko je ostalih populacij (mono+večmer, di+večmer in večmer) malo, z izjemo protiteles proti di+večmerni obliki SAA, ki smo jih določili v najvišjem % pri normalah N1 (12,2%) (slika 17).

V okviru skupin smo opazili najvišji % pozitivnosti na avtoprotitelesa proti SAA, ki prepoznavajo epitope monomerne in dimerne oblike SAA, ter najnižji % pozitivnosti na avtoprotitelesa proti SAA, ki prepoznavajo različne večmerne oblike SAA.

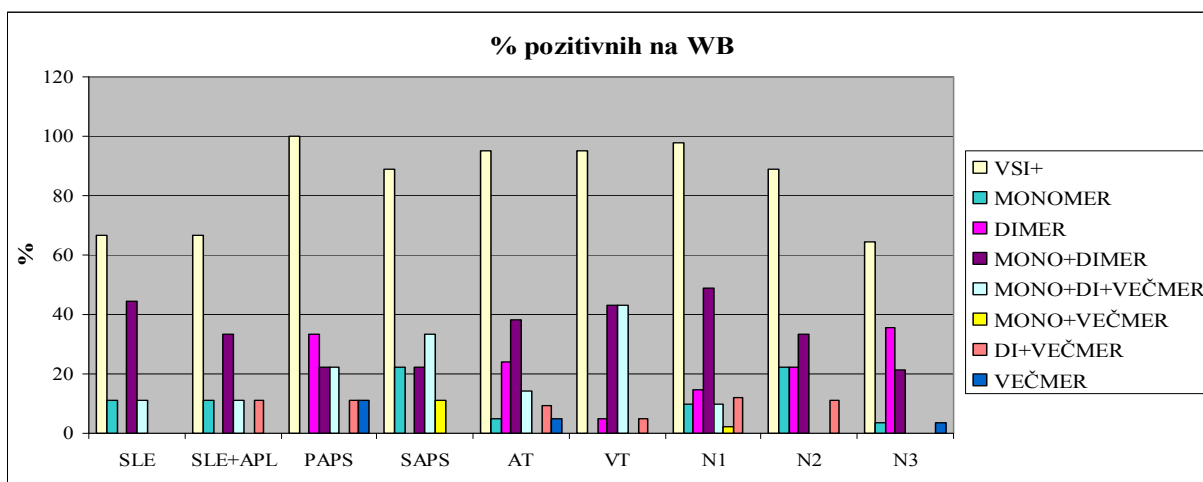


Slika 17: Prikaz % pozitivnih na protitelesa proti različnim populacijam oblik SAA po skupinah s SDS-PAGE/WB (*AT*- arterijska tromboza, *VT*- venska tromboza).

Znotraj skupine avtoimunskih bolnikov smo določili najvišji delež protiteles, ki prepoznavajo mono+dimerno obliko SAA, pri bolnikih s SLE (44,4%) in nato pri bolnikih s SLE+aPL (33,3%) (slika 18), kar je v primeru bolnikov s SLE primerljivo z normalami N1 (48,8%), pri bolnikih s PAPS in SAPS pa smo določili enak delež protiteles (22,2%) (slika 18). Protitelesa, ki prepoznavajo dimerno obliko SAA, pa smo določili le pri bolnikih s PAPS (33,3%) medtem, ko smo pri teh bolnikih določili odsotnost protiteles proti monomerni obliki SAA. Najvišji % protiteles, ki prepoznavajo monomerno obliko SAA smo določili pri bolnikih s SAPS (22,2%) (slika 18). 30,5% od 36 testiranih vzorcev avtoimunskih bolnikov je reagiralo tudi z različnimi večmernimi oblikami SAA, od katerih smo zaznali najvišjo navzočnost protiteles proti mono+di+večmerni obliki SAA, in sicer največ pri bolnikih s SAPS (33,3%), ki značilno odstopajo od normal N1 (9,8%) (slika 18). Populacijo protiteles proti mono+večmerni obliki SAA pa smo določili le pri bolnikih s SAPS (11,1%), medtem ko protitelesa proti večmerni obliki SAA le pri PAPS (11,1%) (slika 18).

Zaključimo lahko, da so si glede na populacijo protiteles proti SAA podobni bolniki z vnetnimi avtoimunskimi boleznimi (SLE, SLE+aPL in SAPS), medtem ko bolniki s PAPS izstopajo s populacijo protiteles, ki prepoznavajo epitope dimerne oblike SAA, ne pa tudi epitope monomerne oblike SAA kot ostale bolezni. Glede na populacijo protiteles proti SAA pa sta si podobni tudi SLE in SLE+aPL, z izjemo protiteles proti epitopom di+večmerne oblike SAA (11,1%), vendar lahko to zanemarimo zaradi majhnega števila

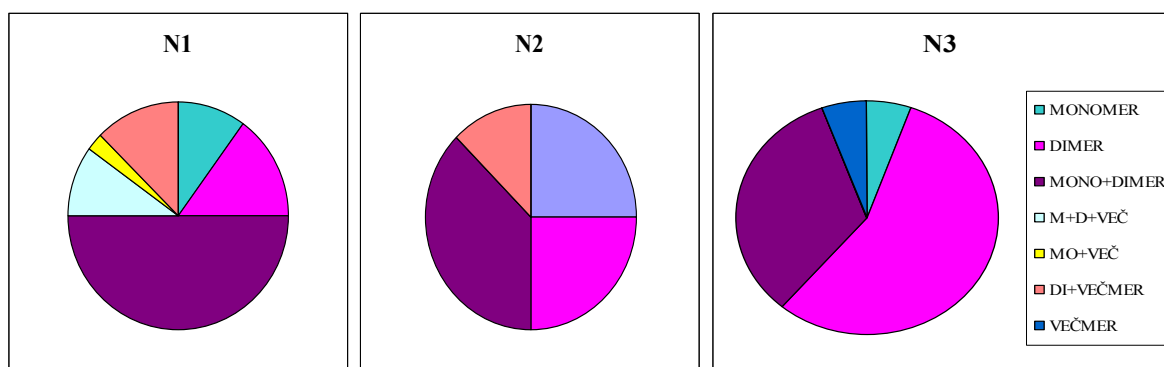
bolnikov. S serološko sliko zdravih krvodajalcev sta si glede protiteles proti monomerni, mono+dimerni in večmerni obliki SAA podobni skupini bolnikov s SLE in SLE+aPL.



Slika 18: Prikaz % pozitivnih na avtoprotitelesa proti različnim populacijam oblik SAA pri zdravih krvodajalcih in bolnikih s SDS-PAGE/WB metodo (*SLE- sistemski lupus eritematozus, SLE+aPL- sistemski lupus eritematozus z antifosfolipidnimi protitelesi, PAPS- primarni antifosfolipidni sindrom, SAPS- sekundarni antifosfolipidni sindrom, AT- arterijska tromboza, VT- venska tromboza*).

Bolniki z AT imajo podobno populacijo protiteles kot normale N1 (slika 18). Bolniki z AT in bolniki z VT pa se razlikujejo glede na populacijo protiteles proti SAA, saj pri bolnikih z VT nismo zaznali protiteles proti monomerni obliki SAA, kakor tudi ne proti sami večmerni obliki SAA (slika 18). Skupini pa sta si podobni v populaciji protiteles, ki prepoznavajo mono+dimerno obliko SAA, ter v odsotnosti protiteles proti mono+večmerni obliki SAA (slika 18). Poleg tega pa smo pri bolnikih z VT določili tudi najvišji delež protiteles (42,9%), ki prepoznavajo mono+di+večmerno obliko SAA (slika 18).

Pri tri leta shranjenih serumih zdravih krvodajalcev (N1) smo določili zdaleč najvišji % protiteles, ki prepoznavajo epitope mono+dimerne oblike SAA (48,8 %), medtem ko je delež drugih populacij protiteles proti SAA (monomerna, dimerne in večmerne oblike) podoben (slika 19). Pri normalah N2 in N3 pa prihaja do razpada večmernih oblik v monomerno in dimerne oblike SAA, pri serumih normal N3 pa tudi do agregacije monomerov v dimere SAA (slika 19). Ugotovili smo tudi, da pozitivnost na protitelesa proti SAA upada s shranjevanjem vzorcev: N1 (97,6%) > N2 (88,9%) > N3 (64,3%) (tabela 1).



Slika 19: Prikaz % pozitivnih na avtoprotitelesa proti različnim populacijam oblik SAA pri zdravih krvodajalcih s SDS-PAGE/WB v obliki tortnega diagrama.

4.2 DETEKCIJA PROTITELES PROTI SAA Z ENCIMSKO IMUNSKO METODO NA TRDNEM NOSILCU (anti-SAA ELISA)

Z hišno izvedbo metode anti-SAA ELISA smo določili odzive v serumih zdravih krvodajalcev (n=179), bolnikov z avtoimunskimi boleznimi (n=83) in trombozami (n=53). Dobljene rezultate smo računsko obdelali. Najprej smo izračunali povprečno absorbanco vzorcev in pozitivne kontrole ter koeficiente variacije, nato pa od povprečne absorbance odšteli absorbanco slepega vzorca ter to pomnožili s koeficientom analize. Koeficient analize smo dobili z aproksimacijo visoko pozitivne kontrole na absorbanco 2,5 (ocenjena absorpcija/izmerjena absorpcija). Nato pa smo se lotili tudi statistične obdelave rezultatov, s čimer smo želeli prikazati distribucijo podatkov, določiti prazne mejne vrednosti (*»cut-off«*) ter metodo anti-SAA ELISA ustrezno analitsko verificirati. Slednje smo zagotovili z določanjem specifičnosti, linearnosti ter natančnosti metode [znotrajanalizna in medanalizna ponovljivosti rezultatov), poleg tega pa določili še diagnostično občutljivost. Sistemskim napakam smo se izognili tako, da smo nanašali vzorce serumov bolnikov in zdravih krvodajalcev na mikrotitersko ploščo vedno po naključnem izboru.

4.2.1 OVREDNOTENJE anti-SAA ELISA

4.2.1.1 DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST

Diagnostično občutljivost rezultatov, pridobljenih z neko metodo, izražamo z deležem oseb, ki imajo prisotna protitelesa proti SAA in, pri katerih je rezultat izvedbe resnično

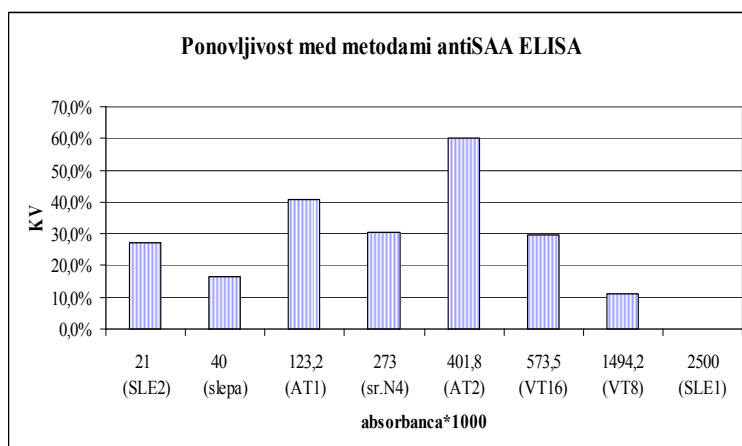
pozitiven (RP). Rezultate anti-SAA ELISA smo razvrstili v tri skupine: fiziološki, nefiziološki pod in nefiziološki nad prazno vrednostjo. Diagnostično občutljivost pa smo izračunali po formuli $(RP/RP+LN [\%])$ tako, da smo kot resnično pozitivne (RP) vzeli fiziološke vrednosti ($n=294$), za lažno negativne (LN) pa nefiziološke vrednosti pod ($n=8$) in nad prazno vrednostjo ($n=12$). Diagnostična občutljivost naše *hišne izvedbe metode* anti-SAA ELISA torej znaša 93,6%.

4.2.1.2 NATANČNOST

Natančnost metode je lastnost metode, merilo te lastnosti pa je ponovljivost, ki jo izražamo z variabilnostnim koeficientom. Cilj vsakega poskusa je dobiti čim manjši možni koeficient variacije (KV%), kljub temu pa ne obstajajo splošno uveljavljena pravila pri imunokemičnih metodah, zato je za adekvatno med- in znotraj-analizno ponovljivost ponavadi sprejemljivo, da je KV manj kot 10% (39) ali z ozirom na analitsko variabilnost, za katero so priporočene vrednosti KV% manjše ali enake kot polovica intrinzične biološke variabilnosti (40, 41).

Za določitev **medanalizne ponovljivosti** rezultatov anti-SAA ELISA smo analizirali 8 vzorcev na enajstih zaporednih mikrotiterskih ploščah ob različnih dnevih in z uporabo istih reagentov, ter izračunali KV za posamezen vzorec $[\%KV = (SD/povprečje) * 100]$. KV slepega vzorca in sedmih serumov, redčenih 1:100, so 16,5; 0; 27,0; 29,7; 11,3; 40,7; 60,2 in 30,3% (slika 20), kar nakazuje, da je metoda relativno neponovljiva, saj imata le VT₈ in pozitivna kontrola (SLE₁) KV enak ali manjši od 10%, zato se bo morala metoda anti-SAA ELISA v prihodnje ustrezno prilagoditi oz. optimizirati za detekcijo protiteles proti SAA za namen klinične uporabe.

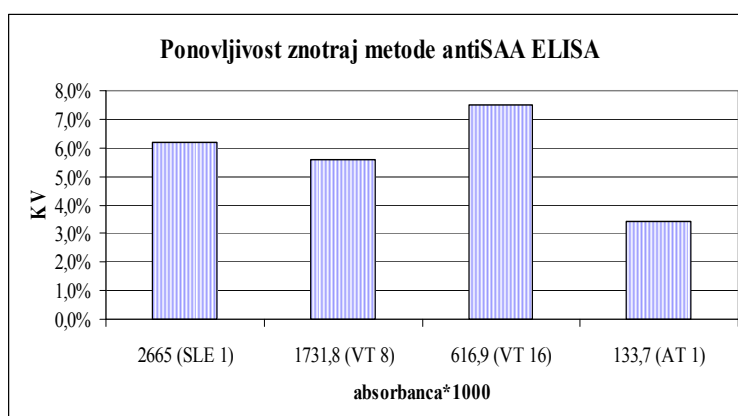
	$\bar{A} * 1000$	SD	KV%
Slepa	40	6,6	16,5
SLE ₁	2500	0,0	0,0
SLE ₂	21	5,7	27,0
VT ₁₆	574	170,5	29,7
VT ₈	1494	169,1	11,3
AT ₁	123	50,1	40,7
AT ₂	402	241,6	60,2
Sr. N ₄	273	82,7	30,3



Slika 20: Prikaz rezultatov \bar{A} , SD in KV% ter profil ponovljivosti rezultatov med metodami anti-SAA ELISA. Graf prikazuje KV [%] pri 8 vzorcih, kateri so razvrščeni po naraščajoči povprečni absorbanci (\bar{A} - povprečna absorbanca, SD- standardna deviacija, KV%- koeficient variacije [%], SLE₁- bolnik s sistemskim lupusom eritematozusom (številka vzorca:1), SLE₂- bolnik s sistemskim lupusom eritematozusom (številka vzorca:2), VT₁₆- bolnik z vensko trombozo (številka vzorca: 16), VT₈- bolnik z vensko trombozo (številka vzorca:8), AT₁- bolnik z arterijsko trombozo (številka vzorca:1), AT₂- bolnik z arterijsko trombozo (številka vzorca:2), Sr. N₄- normala N2 (številka vzorca:4).

Za **znotrajanalizno ponovljivost** metode ELISA smo uporabili eno mikrotitersko ploščo, na katero smo nanegli slepi vzorec (PBS+Tween®20 pufer) in štiri različne serume v različnih zaporedjih tako, da smo dobili za vsak vzorec absorbanco iz različnih pozicij na plošči. Tako smo analizirali 3 vzorce dvanajstkrat in 1 vzorec enajstkrat na eni mikrotiterski plošči znotraj enega dne in z uporabo istih reagentov, ter izračunali KV za posamezen vzorec [% KV= (SD/povprečje)*100]. KV za 4 serume, redčene 1:100, so 6,2; 5,6; 7,5 in 3,4% (slika 21). Vrednosti KV so si zelo primerljive, razen rahlo znižane vrednosti pri serumu bolnika z AT₁ (3,4%) s povprečno A= 0,134 (slika 21). Vse te vrednosti so nižje od 10%, kar nakazuje, da so rezultati meritev ponovljivi znotraj metode anti-SAA ELISA.

	$\bar{A} * 1000$	SD	KV%
Slepa	40		
SLE₁	2665,0	165,3	6,2
VT₈	1731,8	96,7	5,6
VT₁₆	616,9	46,3	7,5
AT₁	133,7	4,6	3,4



Slika 21: Prikaz rezultatov \bar{A} , SD in KV% ter profil ponovljivosti rezultatov znotraj metode anti-SAA ELISA. Graf prikazuje KV [%] štirih vzorcev, kateri so razvrščeni po padajoči povprečni absorbanci (\bar{A} - povprečna absorbanca, SD- standardna deviacija, KV%- koeficient variacije [%], slepa- slepi vzorec (PBS pufer), SLE₁- bolnik s sistemskim lupusom eritematozusom (številka vzorca:1), VT₈- bolnik z vensko trombozo (številka

vzorca:8), VT_{16} - bolnik z vensko trombozo (številka vzorca: 16), AT_1 - bolnik z arterijsko trombozo (številka vzorca: 1)).

4.2.1.3 PRIKAZ ANALIZNE SPECIFIČNOSTI METODE anti-SAA ELISA

Po 11 izvedbah anti-SAA ELISA s slepim vzorcem (PBS+Tween®20) smo dobili zelo nizko povprečno A (tabela 2), kar pomeni, da dodani reagenti ne vplivajo bistveno na odzive pri vzorcih in, da se uporabljajo primerni reagenti za izvedbo imunodetekcije. Poleg srednje vrednosti pa smo izračunali tudi mere variacij (SD in KV%), s čimer smo prikazali, da med členi ni velikih razlik in da se vsi kopičijo okoli srednje točke.

Tabela 2: Prikaz povprečne absorbance (\bar{A}) slepega vzorca in razpršenosti rezultatov s SD in KV% 11 analiz (*SD*- standardan deviacija, *KV%*- koeficient variacije [%]).

SLEPI VZOREC		
$\bar{A} * 1000$	SD	KV%
40	6,6	16,5

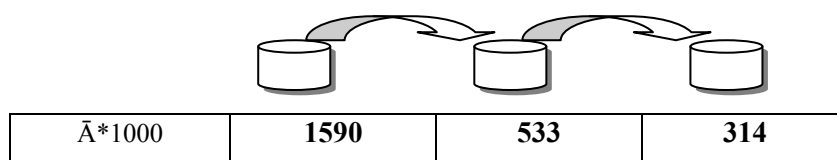
Vsakemu vzorcu seruma smo izmerili odziv v vdolbinicah mikrotiterske plošče, katere površina je bila prekrita z antigenom SAA, in vdolbinici brez antigena SAA (*»vzorčna slepa (SB)«*). Slednja pa nam je služila kot negativna kontrola. Za ponazoritev rezultatov smo izbrali 5 vzorcev s širokim razponom \bar{A} (tabela 3). Absorbance SB pa smo dobili s povprečjem vseh izvedenih analiz za posamezen vzorec, in sicer povprečje 7 analiz za slepi vzorec, vzorec bolnika s SLE_1 in SLE_2 , 4 analiz za VT_{16} in 3 za VT_8 . Pri tem smo ugotovili, da se povprečne absorbance SB ne razlikujejo bistveno med seboj, iz česar lahko sklepamo, da ima SAA primerljiv vpliv na izmerjeno A pri vzorcih. Primerjali smo tudi razpršenost podatkov, izraženo v KV%, iz česar smo ugotovili, da se podatki kopičijo okoli srednje točke, saj smo določili KV pod 20%, pri dveh vzorcih celo pod 10%, razen pri bolniku s SLE_1 (KV=22,1) (tabela 3). Ugotovili smo tudi, da imata slepi vzorec in SB_{slepe} skoraj identično \bar{A} , kar nakazuje, da sam SAA nima bistvenega vpliva na končno A, ampak je rahlo zvišana vrednost \bar{A}_{SB} pri vzorcih z višjo \bar{A} verjetno posledica sestave seruma.

Tabela 3: Prikaz absorbanc SB serumov bolnikov in slepega vzorca (SLE_1 - serum bolnika s sistemskim lupusom eritematosusom (številka vzorca: 1), VT_8 - serum bolnika z vensko

trombozo (številka vzorca: 8), VT_{16} - serum bolnika z vensko trombozo (številka vzorca: 16), SLE_2 - serum bolnika s sistemskim lupusom eritematozusom (številka vzorca: 2).

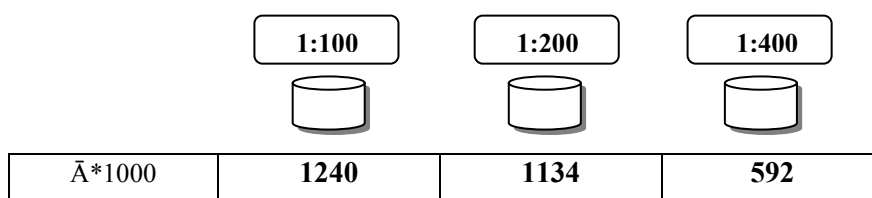
	SLE_1 (A=2,50)	VT_8 (A=1,49)	VT_{16} (A=0,57)	SLE_2 (A=0,02)	Slepi vzorec (A=0,04)
$\bar{A}_{SB} * 1000$	62	60	53	42	37
KV%	22,1	3,5	6,3	15,1	15,0

Pri poskusu pred-adsorpcije smo serum bolnika z AT (AT_5) prenašali iz vdolbinice v vdolbinico plošče in izvajali detekcijo po stopnjah. Pri izvedbi nam je odziv slabil, kar smo pričakovali, saj gre za odstranjevanje protiteles proti SAA iz seruma (izpraznitev seruma). Tako smo že po drugem prenosu zaznali zmanjšanje signala za 67% kot pri prvem nanosu (slika 22), pri tretjem prenosu pa smo zaznali še nižji odziv (signal zmanjšal za 41% glede na drugi prenos).



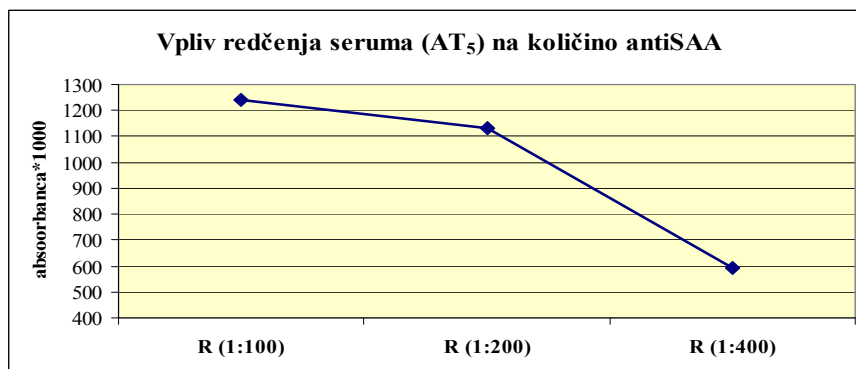
Slika 22: Shematski prikaz poteka pred-adsorpcije seruma bolnika z arterijsko trombozo (številka vzorca: 5) in odzivov po detekciji (\bar{A} - povprečna absorbanca).

Pri različnih redčitvah seruma bolnika z AT (AT_5) nam je odziv slabil v vrstnem redu kot je prikazano na sliki 23. Zanimivo je, da smo pri 2-krat redčenem vzorcu zaznali padec signala le za 9% in ne za 50% kot bi pričakovali, kar je verjetno posledica nasičenja vzorca s protitelesi proti SAA (več protiteles proti SAA kot je vezanega antigena SAA na mikrotiterski plošči). Medtem, ko smo pri 4-krat redčenemu vzorcu zaznali zmanjšanje signala za 52%.



Slika 23: Prikaz odzivov po izvedbi imunodetekcije z različnimi redčitvami seruma bolnika z arterijsko trombozo (številka vzorca: 5) (\bar{A} - povprečna absorbanca).

Z naraščajočo redčitvijo seruma bolnika smo tudi prikazali odvisnost vezave od koncentracije protiteles proti SAA v serumu, saj nam že pri 4-krat redčenemu vzorcu odziv pade za dvakrat, kar nakazuje spodnji graf (slika 24).



Slika 24: Redčitvena krivulja seruma bolnika z arterijsko trombozo (številka vzorca: 5).

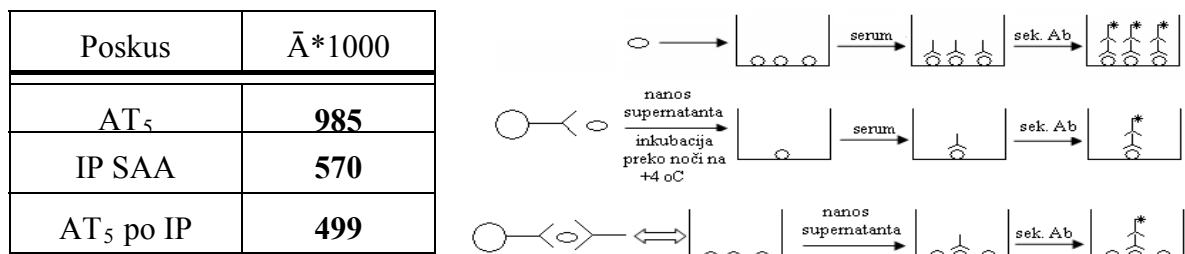
Pri poskusu kompeticije smo pri detekciji vzorca iz seruma in zajčjih protiteles proti SAA v razmerju 1:1 ter tudi 1:5 zaznali povišan odziv (slika 25, stolpec 2 in 3), glede na sam vzorec bolnika (slika 25, stolpec 1), kar ni relevantno s pričakovanji, saj gre za tekmovanje dveh različnih protiteles za vezavna mesta na SAA. To nakazuje na dejstvo, da verjetno zajčja protitelesa proti SAA križno reagirajo s konjugatom kozjih protiteles proti človeškemu IgG, zaradi česar nismo dobili značilnega zmanjšane odziva, ki bi ga sicer pričakovali. Zaradi dvomljivih rezultatov, ki smo jih dobili pri istem poskusu z Western prenosom, smo z anti-SAA ELISA testirali tudi odziv, ki ga dajejo sama zajčja protitelesa proti SAA (Malle pAb #6) in konjugat monoklonskih anti-SAA iz ELISA kita. S testiranjem samih zajčjih protiteles proti SAA smo prikazali križno reaktivnost, saj smo dobili visok odziv (slika 25), in če to vrednost odštejemo od dobljenih absorban, vidimo, da se odziv v bistvu zmanjšuje. Medtem, ko monoklonska protitelesa proti SAA (slika 25), ne vplivajo bistveno na rezultat, saj je absorbanca malo višja kot absorbanca slepega vzorca ($\bar{A}=0,040$).

	AT ₅ (redčen 1:100)	AT ₅ :zajčja aSAA = 1:1	AT ₅ :zajčja aSAA = 1:5	Zajčja aSAA Malle#6	monoklonska anti-SAA*AP iz ELISA
\bar{A} *1000	1216	1373	1257	691	100
		682	566		

Slika 25: Prikaz odzivov po izvedbi poskusa kompetitivne vezave s serumom bolnika z arterijsko trombozo (številka vzorca: 5) in zajčjih protiteles proti SAA (Malle pAb #5 in 6) v razmerju 1:1 in 1:5, ter prikaz povprečne absorbance (\bar{A}) samega seruma bolnika z arterijsko trombozo (številka vzorca: 5), samih zajčjih protiteles proti SAA (Malle pAb #6) in samih monoklonskih anti-SAA iz ELISA kita, označena z AP.

Za primerjavo rezultatov IP smo predhodno izvedli imunodetekcijo seruma bolnika z arterijsko trombozo (AT₅), redčenega v razmerju 1:100 (slika 26). Z IP antigena SAA smo pobrali iz vzorca neznano količino SAA, zaradi česar smo kasneje nanesti na mikrotitersko ploščico manj razpoložljivega antigena SAA za detekcijo protiteles proti SAA, kot navadno (4 mg/L). Pri detekciji s serumom bolnika z AT₅ smo izmerili nižji odziv v primerjavi s serumom brez IP SAA (slika 26).

Pri detekciji supernatanta po IP bolnikovih protiteles proti SAA smo dobili zmanjšan odziv v primerjavi s samim serumom (slika 26), iz česar lahko sklepamo, da smo pobrali ven tako vsa zajčja protitelesa proti SAA (Malle pAb #5 in 6) kot bolnikova protitelesa proti SAA, poleg tega pa prikazali, da ni prihajalo do inhibicije protiteles proti SAA s SAA v raztopini v njihovi nativni obliki, kot so to tudi poročali Rosenau in Schur (14), saj med tem odzivom in odzivom pri IP SAA ni bistvene razlike.

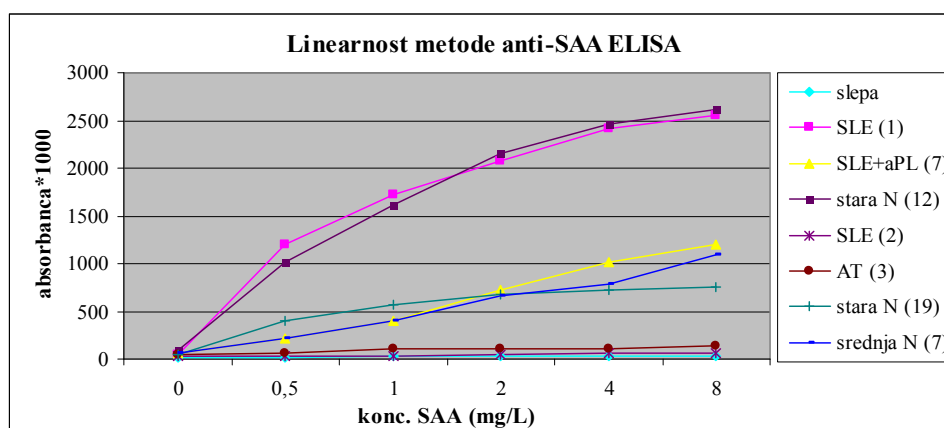


Slika 26: Prikaz poteka in odzivov detekcije seruma bolnika z AT₅ (številka vzorca: 5), seruma AT₅ po IP SAA ter supernatanta po IP bolnikovih protiteles proti SAA (\bar{A} -povprečna absorbanca, sek. Ab- sekundarno protitelo).

4.2.1.4 LINEARNOST MERITVE KONCENTRACIJE SAA Z anti-SAA ELISA

Pri tem poskusu nas je zanimalo, ali se s povečano koncentracijo vezanega antigena SAA na plošči (0, 0.5, 1, 2, 4 in 8 mg/L) povečuje tudi odziv pri anti-SAA ELISA. Za izvedbo detekcije smo uporabili poleg pozitivne kontrole (SLE₁) ter slepega vzorca (PBS+Tween® 20 pufer), tudi 3 serume bolnikov in 3 serume normal z različnim razponom v odzivih.

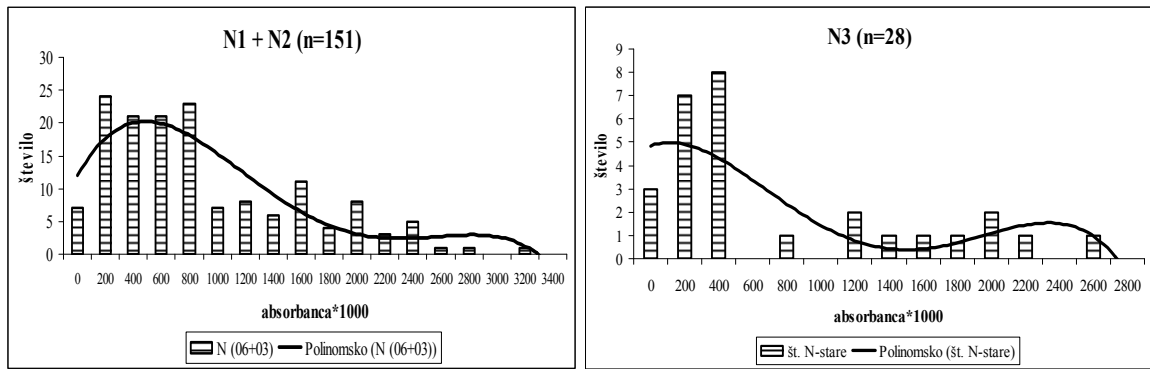
Ugotovili smo, da je dozno odvisni odziv najbolj izrazit pri serumih, katerih odziv je nad prazno vrednostjo, malce manj pa pri tistih serumih, ki izkazujejo odziv v fiziološkem območju absorbanc (od 0,074 do 2,438), kot prikazuje slika 27. Vzorci (SLE₂, AT₃ in slepa) z odzivi pod prazno mejo pa ne izkazujejo dozno odvisnega odziva. Na sliki 27 je tudi razvidno, da pri koncentraciji 4 mg/L na plošči, ki smo jo nanašali za detekcijo protiteles proti SAA, še nismo dosegli platoja krivulje, razen pri stari N₁₉. Srednja N₇ se celo dvigne od 4 mg/L dalje, SLE+aPL₇ se dviguje, SLE₁ in stara N₁₂ pa se začeta umirjati, kljub temu pa je viden trend naraščanja, a še krivulja ni izravnana.



Slika 27: Prikaz vpliva naraščajoče koncentracije antigena SAA na odziv pri različnih bolnikih in zdravih krvodajalcih (*slepa- slepi vzorec (PBS pufer s pH=7.4)*, *SLE (1)- bolnik s sistemskim lupusom eritematozusom (številka vzorca: 1)*, *SLE+aPL (7)- bolnik s sistemskim lupusom eritematozusom z antifosfolipidnimi protitelesi (številka vzorca: 7)*, *stara N (12)- normala N3 (številka vzorca: 12)*, *SLE (2)- bolnik s sistemskim lupusom eritematozusom (številka vzorca: 2)*, *AT (3)- bolnik z arterijsko trombozo (številka vzorca: 3)*, *stara N (19)-normala N3 (številka vzorca: 19)*, *srednja N (7)-normala N2 (številka vzorca: 7)*).

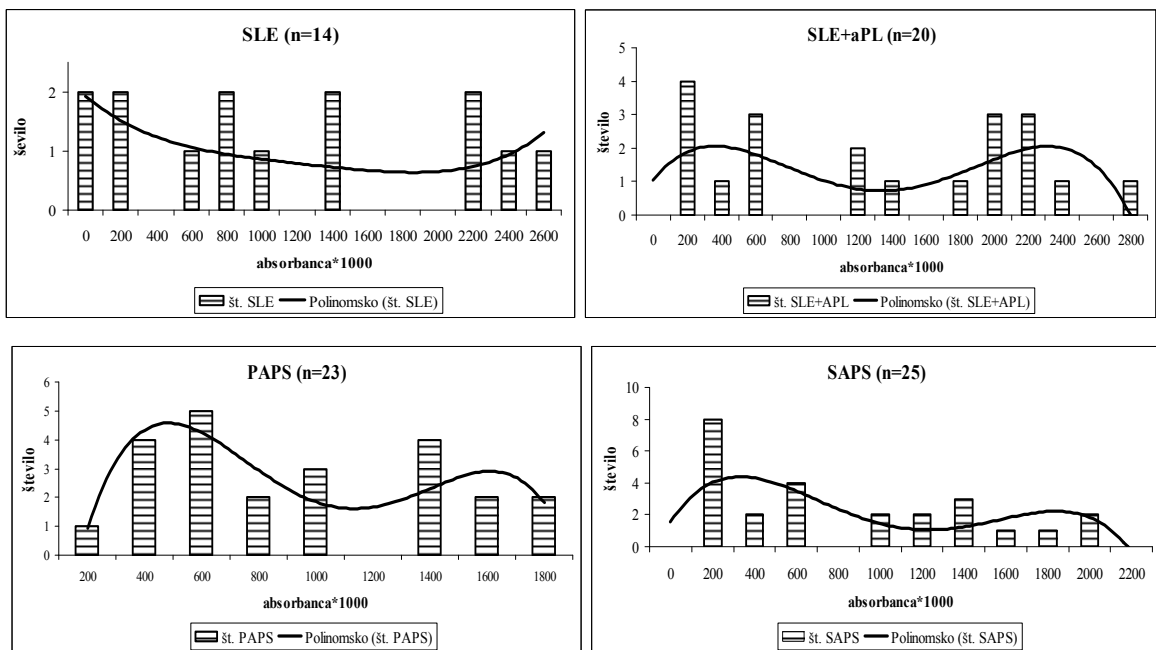
4.2.2 DISTRIBUCIJA PODATKOV

Pri statistični obdelavi podatkov smo ugotovili, da se nam podatki krvodajalcev (slika 28- a in b) ne porazdeljujejo po Gaussovi distribuciji, ampak izkazujejo asimetrično distribucijo v desno z večjo gostoto podatkov pri nižjih vrednostih (test normalne porazdelitve Kolmogorov-Smirnov).



Slika 28: Prikaz frekvenčne porazdelitve podatkov z metodo ELISA pri a) normalah N1 in N2 ter b) normalah N3. Krivulja ponazarja aproksimacijo poteka normalne distribucije.

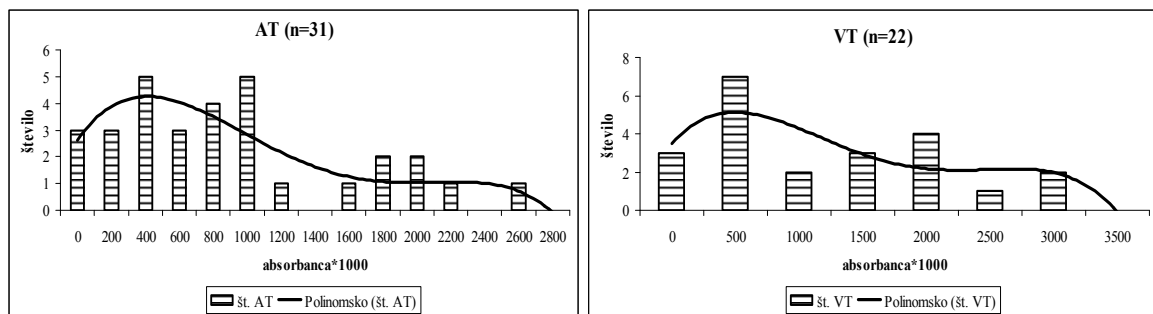
Tudi znotraj skupine bolnikov z avtoimunskimi boleznimi smo zasledili znatno variabilnost v frekvenčni distribuciji podatkov, kar je razvidno iz spodnjih histogramov (slika 29). Tako smo pri bolnikih s SLE in SLE+aPL določili nekaj nizkih in nekaj visokih vrednosti, vmesnih podatkov pa primanjkuje (slika 29- a in b), pri bolnikih s PAPS in SAPS pa smo določili normalam pogojno primerljivo frekvenčno distribucijo (slika 29- c in d).



Slika 29: Prikaz frekvenčne porazdelitve podatkov z metodo ELISA pri a) bolnikih s SLE, b) bolnikih s SLE+aPL, c) bolnikih s PAPS in d) bolnikih s SAPS. Krivulja ponazarja aproksimacijo poteka normalne distribucije (*SLE- sistemski lupus eritematozus, SLE+aPL-*

sistemski lupus eritematozus z antifosfolipidnimi protitelesi, PAPS- primarni antifosfolipidni sindrom, SAPS- sekundarni antifosfolipidni sindrom).

Pri skupini bolnikov s trombozami (AT+VT) smo zasledili podobno frekvenčno distribucijo podatkov (slika 30-a in b). Podatki pri obeh skupinah bolnikov so asimetrično porazdeljeni, krivulja normalne porazdelitve pa pomaknjena v desno. Od vseh bolnikov so bolniki z AT in bolniki z VT, glede na distribucijo podatkov, najbolj primerljivi normalam N1 in N2.



Slika 30: Prikaz frekvenčne porazdelitve podatkov z metodo ELISA pri a) bolnikih z AT in b) bolnikih z VT. Krivulja ponazarja aproksimacijo poteka normalne distribucije (AT-arterijska tromboza, VT- venska tromboza).

4.2.3 PRIKAZ STATISTIČNIH SPREMENLJIVK

Za primerjavo rezultatov smo izračunali različne statistične parametre s pomočjo statističnega programa GraphPad Prism 5.0 za Windows. Zaradi nenormalne porazdelitve podatkov smo uporabili neparametrične statistične opisne spremenljivke podane v tabeli 4. Uporabili smo mediano ali središčno vrednost, ki predstavlja srednjo vrednost lege in ustreza kvantilnemu rangi $P=0,5$ in je enaka drugemu kvartilu. To pomeni, da ima polovica enot manjše, polovica enot pa večje vrednosti od mediane. Njena slabost pa je neobčutljivost na skrajne vrednosti spremenljivk, vendar je primerna, kadar skrajne vrednosti tako odstopajo od ostalih vrednosti, da se pojavi sum, če sploh sodijo v homogeno populacijo. Poleg mediane pa smo prikazali kvantile oz. kvantilne range, ki povedo, na katerem delu celotnega ranžirnega razmika leži določena enota oz. koliki del celote ima manjše vrednosti, kakor je dana vrednost. Skrajne vrednosti pa smo opazovali z maksimumom in minimumom.

Primerjavo median med skupinami bolnikov in normal smo tudi statistično ovrednotili z neparametričnim Mann-Whitneyevim testom, pri čemer smo uporabili razliko za statistično značilno za vrednosti $p < 0,05$. Po obdelavi podatkov smo ugotovili, da se mediane med posameznimi bolniki in normalami, predvsem N1 in N2, ne razlikujejo značilno. Edini značilno različni mediani smo določili med normalami N3 in bolniki s SLE+aPL ($p=0,02$) ter bolniki z VT ($p=0,05$), vendar temu ni moč zaupati, zaradi ugotovljenega vpliva starosti vzorcev. Pri statistični primerjavi skupin bolnikov in normal smo določili značilno razliko le med normalami N3 in bolniki s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi ($p=0,04$).

Tabela 4: Prikaz opisnih spremenljivk pri bolnikih in normalah (*SLE- sistemski lupus eritematozus, SLE+aPL- sistemski lupus eritematozus z antifosfolipidnimi protitelesi, PAPS in SAPS- primarni in sekundarni antifosfolipidni sindrom, AT- arterijska tromboza, VT- venska tromboza, A- absorbanca*).

DIAGNOZA	min.	max.	percentili			
[A*1000]			25	50	75	95
SLE	21	2500	254	904	2208	2500
SLE+aPL	130	2709	507	1321	2108	2695
PAPS	204	1767	538	878	1345	1762
SAPS	162	2071	242	671	1367	2057
AT	47	2639	361	757	1125	2435
VT	98	3151	425	836	2130	3131
N1	45	3210	335	712	1406	2338
N2	107	2637	378	718	1331	2475
N3	7	2687	226	435	1314	2458

4.2.4 PRAŽNE MEJNE VREDNOSTI (»cut-off«)

Podatki so bili analizirani s pomočjo statističnega programa GraphPad Prism 5.0 za Windows. Zaradi nenormalne porazdelitve podatkov smo uporabili neparametrične opisne statistične spremenljivke ter si tako omogočili možnost nadaljnje analize podatkov. Za pražno mejno vrednost smo zaradi primerljive distribucije podatkov izbrali normale N1 in N2, določili pa smo jo tako, da smo uporabili 3. in 97. percentilo, pri čemer smo dobili zgornjo mejno vrednost ($A=2,438$) in spodnjo mejno vrednost ($A=0,074$). Vrednosti, ki so bile znotraj mejnih vrednosti smo vzeli kot fiziološke, tiste, ki so bile nad ali pod tema

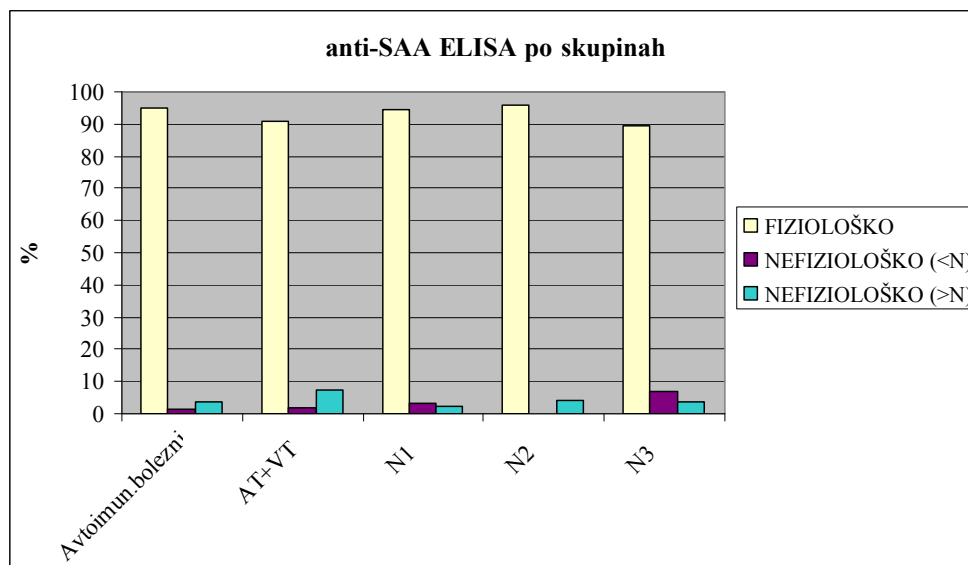
vrednostima pa smo vzeli kot nefiziološke (tabela 5). Za boljšo ponazoritev profila podatkov smo le-te zbrali v diagramu, ki prikazuje razpršenost podatkov in odstopajoče vzorce od praznih vrednosti (slika 32 in 33).

Tabela 5: Prikaz (številčno in %) prisotnosti protiteles proti SAA z anti-SAA ELISA (*SLE*- sistemski lupus eritematozus, *SLE+aPL*- sistemski lupus eritematozus z antifosfolipidnimi protitelesi, *PAPS*- primarni antifosfolipidni sindrom, *SAPS*- sekundarni antifosfolipidni sindrom, *AT*- arterijska tromboza, *VT*- venska tromboza).

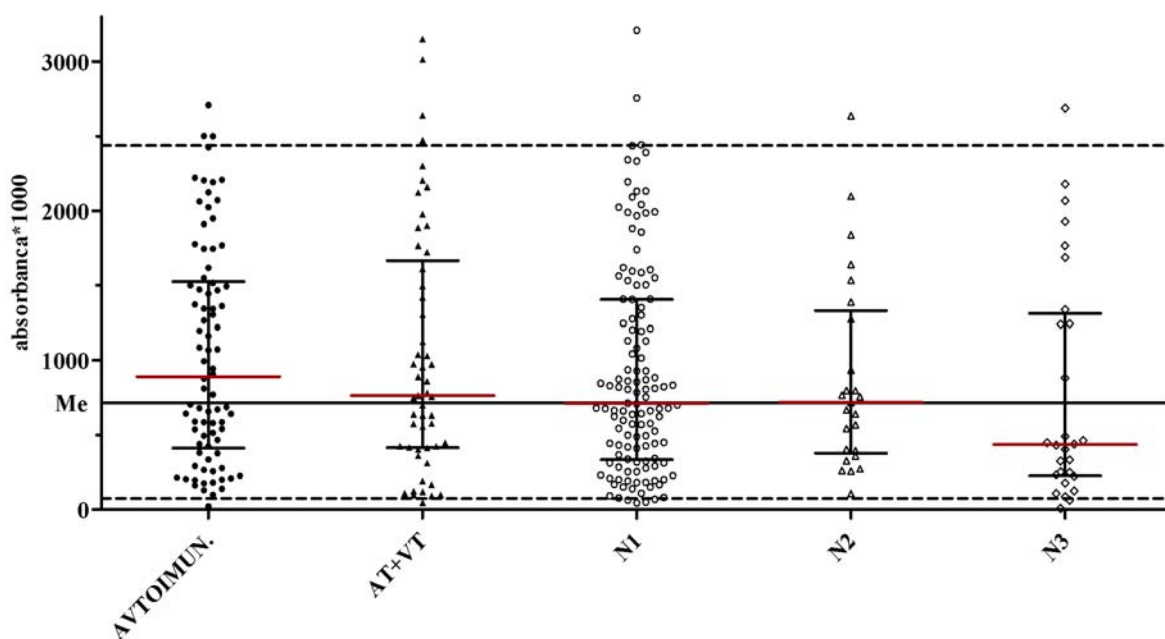
Diagnoza	fiziološko/vsi	%	nefiziološko pod/vsi	%	nefiziološko nad/vsi	%
Sistemske avtoimunske bolezni	78/82	95,1	1/82	1,2	3/82	3,7
	SLE 11/14		SLE 1/14		SLE 2/14	
	SLE+aPL 19/20		SLE+aPL 0/20		SLE+aPL 1/20	
	PAPS 23/23		PAPS 0/23		PAPS 0/23	
	SAPS 25/25		SAPS 0/25		SAPS 0/25	
AT+VT	48/53	90,6	1/53	1,9	4/53	7,5
	AT 29/31		AT 1/31		AT 1/31	
	VT 19/22		VT 0/22		VT 3/22	
Zdravi krvodajalci:						
N1	119/126	94,4	4/126	3,2	3/126	2,4
N2	24/25	96	0/25	0	1/25	4,0
N3	25/28	89,3	2/28	7,1	1/28	3,6

Z metodo anti-SAA ELISA smo določili prisotnost protiteles proti SAA presenetljivo v najvišjem procentu v fiziološkem območju pri normalah N2 (96%), čeprav smo tudi pri normalah N1 (94,4%) ter avtoimunski skupini (95,1%) določili primerljiv delež, pri trombotični skupini in normalah N3 pa nekoliko nižji delež (90,6% oz. 89,3%) (tabela 5). Nefiziološka protitelesa pod spodnjo mejo smo določili v primerljivem deležu v vseh skupinah (1-3%), če izključimo normale N3 (7,1%) (tabela 5, slika 31). Prisotnost nefizioloških protiteles nad zgornjo mejo je med skupinami primerljiva (2-4%), z rahlim zvišanjem pri trombotični skupini (7,5%) (tabela 5, slika 31). Pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi in trombozami pa smo zasledili 4-kratno povišanje nefizioloških protiteles nad prazno mejo v primerjavi s protitelesi pod prazno mejo (slika 31 in 32). Pri skupinah normal smo ugotovili, da pozitivnost na protitelesa proti SAA ne upada z leti shranjevanja vzorcev (tabela 5), kot pri Western prenosu, ampak zelo niha med posameznimi skupinami

krvodajalcev, saj smo pri normalah N1 določili 94,4% pozitivnih na protitelesa proti SAA v fiziološkem območju, pri N2 96,0% ter pri N3 le 89,3% (slika 31), vendar kaže na to, da tako kot pri WB tudi pri metodi ELISA pozitivnost na protitelesa proti SAA upada s shranjevanjem vzorcev. Zanimivo je tudi, da smo le pri normalah N2 določili odsotnost nefizioloških protiteles pod spodnjo mejo (slika 31 in 32), medtem ko pri normalah N1 primerljiv delež nefizioloških protiteles pod in nad pražno mejo (slika 31).

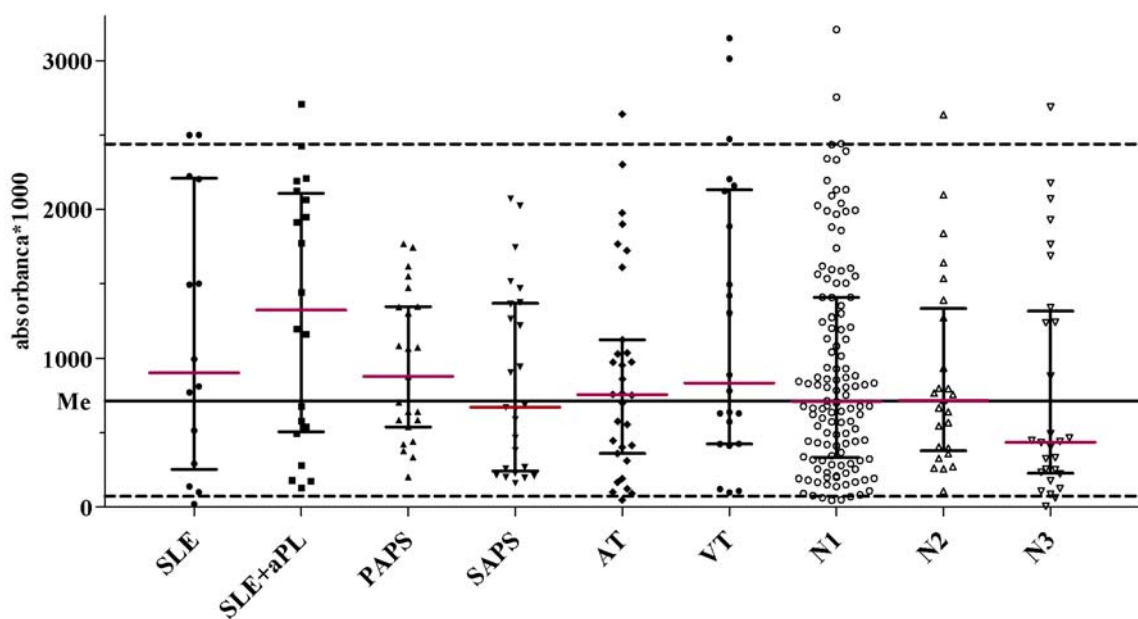


Slika 31: Prikaz prisotnosti (%) protiteles proti SAA po skupinah z anti-SAA ELISA (*AT*-arterijska tromboza, *VT*-venska tromboza).



Slika 32: Prikaz antiSAA imunoreaktivnosti serumov različnih skupin bolnikov in zdravih krvodajalcev ugotovljeno z metodo anti-SAA ELISA. Sredinska neprekinjena črna črta v grafu prikazuje mediano absorbanc serumov zdravih krvodajalcev ($\bar{A}=0,714$), zgornja prekinjena črta prikazuje 97. percentilo ($A=2,438$) ter spodnja črta 3. percentilo ($A=0,074$). Posamezne rdeče neprekinjene črte pri vsaki skupini prikazujejo mediano, navpična črta do vrhnjega in spodnjega roba pa interkvartilno območje (razlika med Q1 in Q3) (*Avtoimun.-bolniki s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi, AT- arterijska tromboza, VT- venska tromboza, Q1- prvi kvartil oz. 25. percentil in Q3- tretji kvartil oz. 75. percentil*).

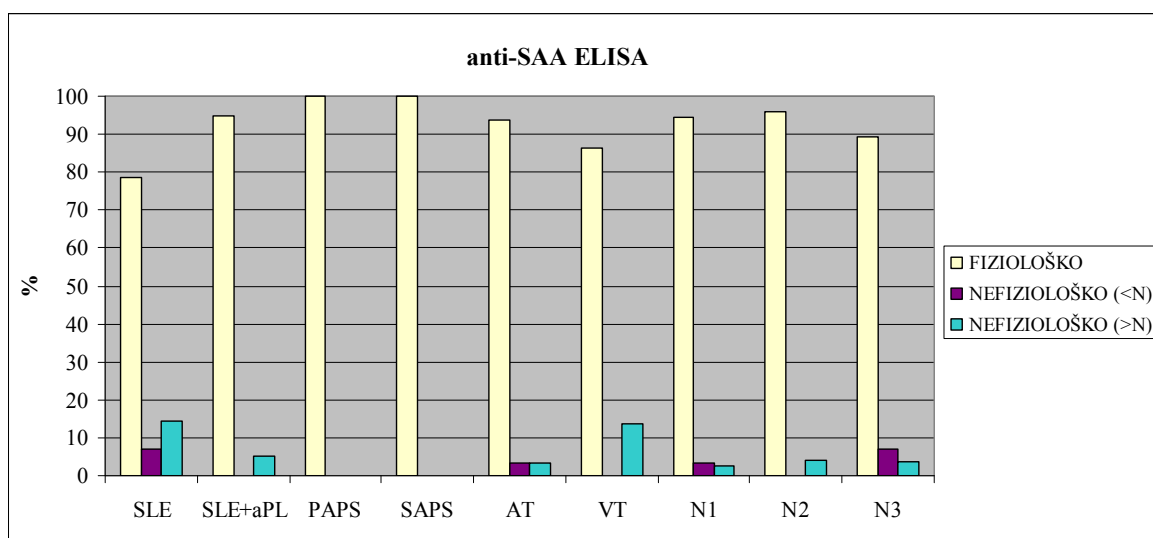
Znotraj skupine avtoimunskih bolnikov smo določili najvišji delež protiteles proti SAA v fiziološkem območju pri PAPS (100%) in SAPS (100%) (slika 34) ter nato pri SLE+aPL (95%), najmanj pa pri SLE (78,6%) (slika 34). Nefiziološka protitelesa nad zgornjo mejo se pojavljajo le pri SLE in SLE+aPL (14,3% oz. 5%), protitelesa pod spodnjo mejo pa le pri bolnikih s SLE (7,1%) (slika 33 in 34). Ugotovili smo tudi, da pri bolnikih s SLE+aPL, PAPS in SAPS nismo zaznali protiteles pod prazno mejo (slika 33 in 34). Zanimivo je, da smo od vseh testiranih serumov bolnikov določili odsotnost protiteles nad zgornjo mejo le pri bolnikih s PAPS in SAPS, kakor tudi prisotnost nefizioloških protiteles pod spodnjo mejo le pri bolnikih s SLE in AT (7,1% in 3,2%), kar je razvidno tudi iz spodnjega diagrama (slika 33).



Slika 33: Prikaz antiSAA imunoreaktivnosti serumov različnih bolnikov in zdravih krvodajalcev ugotovljeno z metodo anti-SAA ELISA. Sredinska neprekinjena črna črta v

grafu prikazuje mediano absorbanco serumov zdravih krvodajalcev ($\bar{A}=0,714$), zgornja prekinjena črta prikazuje 97. percentilo ($A=2,438$) ter spodnja črta 3. percentilo ($A=0,074$). Posamezne rdeče neprekinjene črte pri vsaki skupini prikazujejo mediano, navpična črta do vrhnjega in spodnjega roba pa interkvartilno območje (razlika med Q1 in Q3) (*SLE- sistemski lupus eritematozus, SLE+aPL- sistemski lupus eritematozus z antifosfolipidnimi protitelesi, PAPS in SAPS- primarni in sekundarni antifosfolipidni sindrom, AT in VT- arterijska in venska tromboza, Q1- prvi kvartil oz. 25. percentil in Q3- tretji kvartil oz. 75. percentil*).

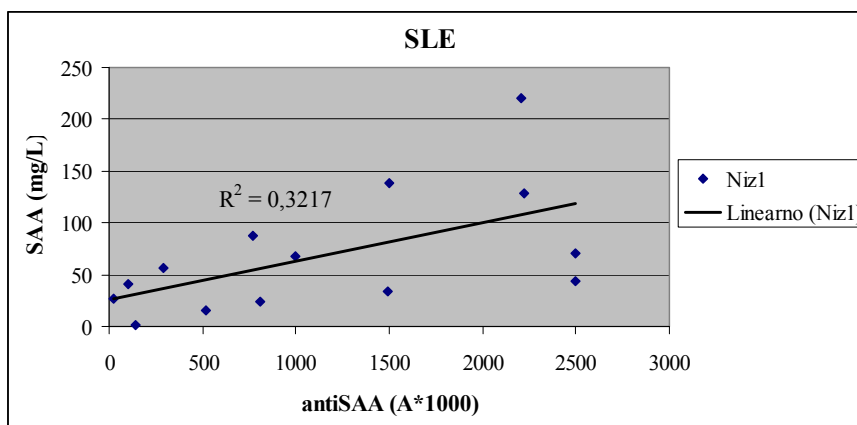
Pri skupini bolnikov s trombozami (AT+VT) smo zasledili podobno frekvenčno distribucijo podatkov, a z različnima medianama (tabela 4, slika 30 in 33). Pri bolnikih z AT smo zaznali primerljivo razpršenost podatkov normalam N1, v območjih fizioloških mejnih vrednosti (93,6%) in nefizioloških vrednosti pod spodnjo (3,2%) in nad zgornjo mejo (3,2%) (slika 34). Medtem, ko smo pri bolnikih z VT določili nižji delež fiziološko prisotnih protiteles proti SAA (86,4%) kot pri AT kot tudi normalah N1, ter odsotnost nefizioloških protiteles pod spodnjo mejo ter eno izmed najvišje prisotnih nefizioloških protiteles nad zgornjo mejo (13,6%) (slika 34).



Slika 34: Prikaz prisotnosti (%) protiteles proti SAA pri bolnikih in zdravih krvodajalcih z anti-SAA ELISA (*SLE- sistemski lupus eritematozus, SLE+aPL- sistemski lupus eritematozus z antifosfolipidnimi protitelesi, PAPS in SAPS- primarni in sekundarni antifosfolipidni sindrom, AT- arterijska tromboza, VT- venska tromboza*).

4.3 PRIMERJAVA NIVOJEV PROTITELES PROTI SAA Z NIVOJI SERUMSKE KONCENTRACIJE SAA

Nivoje protiteles proti SAA pri 131 bolnikih kakor tudi pri 51 zdravih krvodajalcih smo primerjali z nivoji serumske koncentracije SAA, slednje podatke smo pridobili iz že poprej opravljenih izvedb SAA ELISA v Laboratoriju za imunologijo revmatizma. Med akutno faznim odzivom se serumska koncentracija SAA lahko poviša celo do 1000-krat. V naši študiji so bile serumske vrednosti SAA pri SLE (n=14), AT (n=31) in normalah (n=51) povprečno 68,4; 29,4 ter 41,9 mg/L. Ker smo »cut-off« vrednost za SAA (65 mg/L) že predhodno določili (7) na 60 krvodajalcih, se vse tri koncentracije gibljejo blizu ali v mejah fiziološke koncentracije. Pri SLE+aPL (n=18), PAPS (n=21), SAPS (n=25) in VT (n=22) pa smo zaznali zvišane vrednosti SAA, in sicer: 233,4; 217,5; 259 ter 497,6 mg/L. Korelacijo nivojev protiteles proti SAA z nivoji serumskega SAA smo statistično določili s pomočjo Spearmanovega korelacijskega koeficienta (ρ), pri čemer smo ugotovili korelacijo le pri bolnikih s SLE ($\rho=0,587$, $p<0,03$) (slika 35), za druge bolezni pa te korelacije nismo dokazali.



Slika 35: Grafični prikaz korelacije med nivoji protiteles proti SAA in nivoji serumske koncentracije SAA pri bolnikih s SLE (*SLE*- sistemski lupus eritematozus, *A*-absorbanca).

4.4 RAZLAGA

Prisotnost protiteles proti SAA smo ugotavljali s pomočjo metode SDS-PAGE in prenosa Western, pri čemer smo zaznali presenetljivo visoko navzočnost protiteles proti SAA v vseh testiranih skupinah (avtoimunski bolniki, trombotični bolniki in zdravi krvodajalci),

kar je v nasprotju z edino študijo določanja protiteles proti SAA (14). V nadaljevanju pa smo želeli te rezultate potrditi še z drugo imunokemijsko metodo za določanje protiteles, tj. indirektna anti-SAA ELISA. S slednjo metodo smo uspešno potrdili visoko navzočnost protiteles proti SAA v vseh testiranih skupinah. Zaradi različnega podajanja rezultatov direktna primerjava obeh metodik ni možna.

S SDS-PAGE/Western prenosom smo ugotovili, da se večina protiteles veže na epitope monomerne in dimerne oblike SAA, zelo majhni del pa na večmerne oblike SAA. Pri vnetnih avtoimunskih boleznih (SLE, SLE+aPL in SAPS) smo z Western prenosom ugotovili, da izkazujejo podobno populacijo protiteles, saj smo pri vseh boleznih zaznali v največjem deležu protitelesa proti monomerni ter mono+dimerni obliki SAA, a odsotnost protiteles proti dimerni obliki SAA. Največjo navzočnost protiteles proti večmernim oblikam SAA smo določili pri boleznih s trombotičnimi zapleti (PAPS, SAPS, AT in VT), kar nakazuje na morebitno vpletenost oligomernih oblik SAA pri trombozah. Z Western prenosom smo ugotovili, da bolniki s SLE, SLE+aPL ter AT sovpadajo z zdravimi krvodajalci glede na populacijo protiteles proti SAA. V študiji Sodin-Šemrl in sodelavcev (7) so prikazali, da služi SAA kot razlikovalni marker med PAPS in SAPS, kar smo zaznali tudi s protitelesi proti SAA v naši študiji s prenosom Western, ne pa tudi z anti-SAA ELISA. Na drugi strani pa smo z anti-SAA ELISA določili v vzorcih vseh skupin presenetljivo visoko prisotnost protiteles proti SAA, ki smo jih označili kot fiziološko prisotna, medtem ko so nefiziološka protitelesa pod in nad prazno vrednostjo zastopana v zelo majhnem delu. Prisotnost nefizioloških protiteles nad zgornjo mejo je med skupinami primerljiva, z rahlim zvišanjem pri trombotični skupini, medtem ko smo nefiziološka protitelesa pod spodnjo mejo določili v primerljivem deležu v vseh skupinah, razen normal N3, ki značilno odstopajo od preostalih vzorcev, kar smo statistično potrdili pri SLE+aPL ter VT, kakor tudi skupini avtoimunskih bolnikov. Zanimivo je, da pri bolnikih s PAPS in SAPS nismo zaznali protiteles proti SAA nad in pod prazno vrednostjo, vendar se bo morala pomembnost te odsotnosti pri bolnikih s prokoagulatnimi dogodki potrditi z nadaljnjimi raziskavami. Poleg tega pa smo z anti-SAA ELISA določili prisotnost nefizioloških protiteles pod spodnjo mejo le pri bolnikih s SLE in AT. Od vseh vzorcev smo samo pri bolnikih z AT zaznali primerljivo razpršenost podatkov normalam N1, v območjih fizioloških mejnih vrednosti ter nefizioloških vrednosti pod in nad prazno vrednostjo. Medtem, ko smo pri bolnikih s SLE in z VT določili eno izmed najvišje prisotnih nefizioloških protiteles nad zgornjo mejo. Pri bolnikih z avtoimunskimi

boleznimi in trombozami pa smo zasledili 4-kratno povečanje nefizioloških protiteles nad pražno mejo v primerjavi s protitelesi pod pražno mejo. Pri poskusu primerjave obeh metodik določanja protiteles proti SAA smo ugotovili, da smo pri obeh določili najvišjo navzočnost pri bolnikih s PAPS, ki je primarno sistemsko nevnetna bolezen, pri boleznih z vnetnim karakterjem (SLE, SLE+aPL in SAPS) pa je prišlo do manjših odstopanj. Prav tako smo pri AT in VT določili primerljiv delež z obema metodama. Pri skupini zdravih krvodajalcev pa smo preko obeh metod opazili, da pozitivnost na protitelesa proti SAA upada s shranjevanjem vzorcev (tabela 6).

Tabela 6: Primerjava rezultatov pridobljenih s SDS-PAGE/WB in anti-SAA ELISA (*AT-arterijska tromboza, VT- venska tromboza*).

	WB	ELISA (fiziološko)
Sistemske avtoimunske bolezni	80,6%	95,1%
AT+VT	95,2%	90,6%
Zdravi krvodajalci		
N1	97,6%	94,4%
N2	88,9%	96%
N3	64,3%	89,3%

Specifičnost vezave protiteles proti SAA na antigen SAA smo določali preko obeh metod na več načinov, in sicer izvedli smo a) negativne in pozitivne kontrole, b) dozno odvisni odziv za SAA, c) pred-adsorpcijo seruma, d) detekcijo z različnimi redčitvami seruma, e) reakcijo kompeticije med bolnikovimi protitelesi proti SAA in zajčjimi protitelesi proti SAA, f) IP SAA z uporabo Protein A/G- agaroze in preinkubacijo z zajčjimi protitelesi proti SAA ter g) IP bolnikovih protiteles proti SAA z uporabo Protein A/G- agaroze in preinkubacijo z zajčjimi protitelesi proti SAA in SAA. S pomočjo teh izvedb smo dokazali specifičnost vezave protiteles proti SAA na antigen SAA, saj smo z anti-SAA ELISA potrdili rezultate pridobljene z Western prenosom, zato lahko potrdimo, da sta metodi sposobni za razlikovanje med merjeno snovjo in drugimi snovmi v serumu. Pri anti-SAA ELISA smo zaznali večji delež protiteles proti SAA kot tudi zelo visoko diagnostično občutljivost podatkov, poleg tega pa je metoda ELISA kvantitativna in izkazuje bistvene prednosti pred Western prenosom, ki le potrjuje prisotnost in odsotnost protiteles. Slednja uporablja kot tarčno molekulo imobiliziran hrSAA, ki je denaturiran preko SDS-PAGE.

Posledično se lahko vežejo le tista protitelesa, ki prepoznavajo linearne epitope SAA na membrani (antigenske determinante s specifično AK sekvenco, karbohidratno skupino, itd.), ne pa tudi protitelesa proti konformacijskim epitopom, za katere so predlagali, da se izpostavijo po imobilizaciji na trdno površino (14). Ta opažanja smo tudi potrdili s poskusoma IP SAA ter protiteles proti SAA, kjer smo prikazali, da protitelesa proti SAA ne inhibirajo SAA v raztopini, torej v njegovi nativni obliki, medtem ko so po imobilizaciji SAA na negativno nabito površino, tj. obsevano EIA ploščo, zaznali inhibicijo (14). To nakazuje, da vezava SAA na ploščo in morda tudi na celice *in vivo* povzroči razvitje proteina tako, da se izpostavijo konformacijski (neoantigenski) epitopi. Rosenau in Schur sta zato predlagala (14), da se avtoprotitelesa proti SAA tvorijo ne proti nativni obliki SAA, ki je normalno prisotna v telesu, ampak proti neoepitopom, ki so sedaj prepoznavni kot antigenski in/ali tuji. To priča k dejstvu, da je konformacijska sprememba proteina kritična za prepoznavo s protitelesi proti SAA (14).

V študiji sta Rosenau in Schur (14) preučevala prisotnost protiteles proti SAA pri bolnikih s SLE, kjer sta detektirala prisotnost pri 6 od 8 serumov (75%), in pri drugih vnetnih kardiovaskularnih boleznih, kot so stenoza aorte (100% od 3), globoka venska tromboza (41,7% od 12), atrijska fibrilacija (53,9% od 13) in cerebralni dogodki (kap) (46,2% od 13). V tej študiji so zaznali protitelesa proti SAA le pri enem od 62 serumov zdravih krvodajalcev, kar je v nasprotju z našo študijo, kjer smo z metodo SDS-PAGE/WB določili prisotnost protiteles proti SAA pri 40 od 41 serumov (97,6%) ter z anti-SAA ELISA pri 119 od 126 serumov (94,4%) normal N1, a smo opazili primerljivo prisotnost protiteles proti SAA pri bolnikih s SLE (66,7% s SDS-PAGE/WB in 78,6% z anti-SAA ELISA) in višjo pri bolnikih z VT (95,2% s SDS-PAGE/WB in 86,4% z anti-SAA ELISA) v primerjavi s študijo Rosenau in Schura. Te razlike med našo študijo in študijo Rosenau in Schur so lahko odraz razlik v izbiri antigena SAA, v metodologiji same izvedbe ELISA za detekcijo protiteles proti SAA, odsotnosti mednarodnih standardov, praznih vrednosti ali razlik v izbiri skupin populacij. Tri glavne razlike v izvedbi ELISA so opazne, in sicer v izbiri pufra (k BSA-PBS pufri smo dodali emulgator Tween-20), viru humanega SAA [uporabili hrSAA (Peprotech, UK), v omenjeni študiji pa nativni humani SAA (Biosource, CA, ZDA)] in koncentracije SAA na plošči (na ploščo nanašali po 4 mg/L SAA, v omenjeni študiji pa 2 mg/L) ter časih inkubacije s serumi (izvedli le 1 uro, v omenjeni študiji preko noči) in s substratom (v omenjeni študiji so izvajali točno 1 uro, v naši študiji pa približno 10 minut dokler ni absorbanca visoko pozitivne kontrole dosegla približno

2,5). Vendar glede na podatke iz podobnih študij o protitelesih proti CRP (15, 27) dodatek Tweena-20 k pufru, časi inkubacije ter koncentracija SAA na plošči (prikazali tudi z dozno odvisnim odzivom) ne vplivajo bistveno na rezultat. Izvor antigena SAA pa bi lahko bil odločilen dejavnik za obstoječe razlike.

V naši študiji smo zasledili približno enako frekvenco pri bolnikih in zdravih s SDS-PAGE/WB, z anti-SAA ELISA pa celo rahlo zvišano prisotnost protiteles proti SAA v avtoimunski skupini. Visok nivo avtoprotiteles proti SAA pri zdravi populaciji nakazuje na možno regulatorno in fiziološko vlogo kot »naravna« avtoprotitelesa (NAbs). NAbS izpolnjujejo pomembne in mnogovrstne imunološke vloge, poskrbijo za zelo zgodnjo naravno imunsko zaščito, zagotovijo odstranitev morebitnih avtoantigenov in apoptotičnih celičnih ostankov preko opsonizacije in fagocitoze ter verjetno tudi izboljšujejo kardiovaskularni profil (19). Čeprav natančne fiziološke vloge NAbS ne poznamo predvidevajo, da NAbS predstavljajo filter, ki »zaslepi« imunski sistem do tujih antigenov, ki lahko po naključju vsebujejo križno reaktivne lastne epitope, zato bi lahko NAbS, ki prepoznavajo lastne in tuje antigene, preprečevala razvoj avtoimunskih bolezni (Cohen in Cooke, 1986), čeprav so ti mehanizmi verjetno veliko bolj kompleksni, saj tudi med samimi NAbS obstajajo obsežne interakcije verjetno preko idiotip-antiidiotipske mreže, ki uravnava imunski odziv do tujih antigenov in preprečuje razvoj patogenih avtoprotiteles (20,22). Domnevamo, da bi lahko avtoprotitelesa proti SAA regulirala imunoinflamatorne procese, posredovane s SAA, saj se njegova koncentracija med akutno faznim odzivom lahko poveša tudi do 1000-krat. Tako bi lahko bila vpletena v odstranjevanje (»klirens« mehanizem) presežka SAA, s čimer bi preprečila njihovo akumulacijo v telesu. Znano je, da kronično povišane koncentracije SAA vodijo v sekundarno amiloidozo, poleg tega pa tudi k patofiziološkim procesom ateroskleroze, revmatoidnega artritisa ter drugih kardiovaskularnih bolezni, kot tudi v indukcijo avtoimunskih reakcij. Poleg morebitne regulatorne vnetne vloge avtoprotiteles proti SAA pa bi se lahko ta avtoprotitelesa vključevala tudi v regulacijo avtoimunskih bolezni, saj smo v naši študiji s pomočjo anti-SAA ELISA dokazali visoko prisotnost avtoprotiteles proti SAA v tej skupini, kot tudi korelacijo nivojev protiteles proti SAA z nivoji serumskega SAA pri bolnikih s SLE.

Čeprav natančne *in vivo* funkcije SAA ne poznamo, nakazujejo visoka konzervacija med vrstami, široka ekspresija v tkivih/celicah in dramatično povišanje indukcije med vnetjem na bistveno protektivno vlogo SAA med akutno faznim odzivom, tj. zgodnji obrambni odziv na vnetje kot posledica tkivne poškodbe, mikrobne infekcije ali travmatske

poškodbe. Zanimivo je, kako lahko tako relativno majhen protein (12 kDa) zmožen posredovati ali direktno izvesti tako različne funkcije v smislu vnetnih reakcij in drugih bioloških obrambnih mehanizmov. Različne funkcije SAA so verjetno modulirane preko konformacijske spremembe po vezavi liganda ali preko sposobnosti za prisvojitve več kot enega oligomernega stanja (24). Ker SAA igra tudi pomembno vzročno vlogo v aterosklerozi in predstavlja označevalec za povečano smrtnost zaradi srčno žilnih bolezni, sta Rosenau in Schur mnenja (14), da so protitelesa proti SAA primarno kardiovaskularne narave, vendar je ena od slabosti njihove študije malo število bolnikov. Ker je sama prisotnost avtoprotiteles proti SAA še za sedaj velika uganka, so zato potrebne nadaljnje raziskave za razjasnitev same indukcije sinteze, razreda/izotipa imunoglobulinov, avidnosti/ afinitete interakcij, vpliva protivnetnih in imunosupresivnih učinkovin na količino avtoprotiteles proti SAA ter nenazadnje tudi biološke oz. morebitne patološke vloge.

5. SKLEPI

V okviru diplomske naloge smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Z hišno izvedbo metode anti-SAA ELISA pod navedenimi pogoji lahko uspešno določamo prisotnost avtoprotiteles proti SAA.
- Z denaturirajočo in reducirajočo SDS-PAGE pod navedenimi pogoji lahko ločimo protein SAA; po Western prenosu pa lahko detektiramo avtoprotitelesa proti različnim oligomernim oblikam SAA.
- V serumih zdravih krvodajalcev smo določili presenetljivo visoko navzočnost avtoprotiteles proti SAA, in sicer:
 - a) Z Western prenosom smo določili prisotnost pri 84,6% serumov (66/78).
 - b) Z anti-SAA ELISA smo določili prisotnost pri 93,9% serumov (168/179) (fiziološko določena protitelesa proti SAA).
- V skupini bolnikov z avtoimunskimi boleznimi in trombozami smo z obema metodama določili primerljivo prisotnost protiteles proti SAA, in sicer:
 - a) Avtoimunska skupina: z Western prenosom smo določili prisotnost pri 80,6% serumov (29/36), z anti-SAA ELISA pa pri 95,1% serumov (78/82).
 - b) Trombotična skupina: z Western prenosom smo določili prisotnost pri 95,2% (40/42) serumov, z anti-SAA ELISA pa pri 90,6% serumov (48/53).
- S primerjavo nivojev protiteles proti SAA z nivoji serumskega SAA smo ugotovili korelacijo pri bolnikih s SLE.
- Zaradi različnega podajanja rezultatov sama primerjava obeh metodik ni možna, vendar smo z anti-SAA ELISA potrdili visoko navzočnost avtoprotiteles proti SAA v vseh skupinah, ki smo jo določili z Western prenosom.

6. LITERATURA

1. Vozelj M: Temelji imunologije, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2000; 62, 107-113, 275-303, 327-352
2. Bresjanac M, Ribarič S, Rupnik M: Patofiziologija s temelji fiziologije, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 1998; 41-42, 159-161
3. Bresjanac M: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, 9. izdaja, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2005; 46-54
4. Dolenshek J: Vnetje, Seminar pri predmetu fiziologija, Medicinska fakulteta Maribor, 2007
5. Uhlar CM, Whitehead AS: Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999; 265: 501-523
6. Jensen LE, Whitehead AS: Regulation of serum amyloid A protein expression during acute-phase response. *Biochem J* 1998; 334: 489-503
7. Sodin-Šemrl S, Žigon P, Čučnik S, Kveder T, Blinc A, Tomšič M, Rozman B: Serum amyloid A in autoimmune thrombosis. *Autoimmunity Rev* 2006; 6 (1): 21-27
8. O'Hara R, Murphy EP, Whitehead AS, FitzGerald O, Bresnihan B: Acute-phase serum amyloid A production by rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Res* 2000; 2: 142-144
9. Chait A, Han CY, Oram JF, Heinecke JW: Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *J Lipid Res* 2005; 46: 389-403
10. Malle E, De Beer FC: Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practise. *Eur J Clin Invest* 1996; 26 (6): 427-435
11. Human SAA, Protokol Booklet, Biosource, Belgija, 2007; 4-7
12. Ekart R, Bevc S, Dajčman D, Hojs R: Sekundarna amiloidoza ob Chronovi bolezni ter nefrotični sindrom: prikaz primera. *Zdrav Vestn* 2004; 73: 177-9
13. Morrow DA, Rifai N, Antman EM, Weiner DL, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E: Serum amyloid A predicts early mortality in acute coronary syndromes: A TIMI 11A substudy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35 (2): 358-362

14. Rosenau BJ, Schur PH: Antibody to serum amyloid A. *J Autoimmun* 2004; 23: 179-182
15. Rosenau BJ, Schur PH: Antibodies to C reactive protein. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 674-676
16. Sjöwall C, Wetterö J: Pathogenic implications for autoantibodies against C-reactive protein and other acute phase proteins. *Clin Chim Acta* 2007; 378: 13-23
17. Bell SA, Faust H, Schmid A, Meurer M: Autoantibodies to C-reactive protein (CRP) and other acute-phase proteins in systemic autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 327-332
18. Pepys MB, Baltz ML: Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983; 34: 141-212
19. Amital H, Shoenfeld Y: Natural autoantibodies, heralding, protecting and inducing autoimmunity, v Peter JB, Shoenfeld Y: *Autoantibodies*. Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, 2007; 7-12
20. George J, Shoenfeld Y: Natural autoantibodies, v Peter JB, Shoenfeld Y: *Autoantibodies*. Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, 1996; 534-538
21. Peterson LK, Fujinami RS: Molecular mimicry, v Peter JB, Shoenfeld Y: *Autoantibodies*. Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, 2007; 13-18
22. Forrester JV, Stott DI, Hercus KM: Naturally occurring antibodies to bovine and human retinal S antigen: a comparison between uveitis patients and healthy volunteers. *Brit J of Ophthal* 1989; 73: 155-159
23. Kuhelj R: *Biokemija v praksi: načela in tehnike*, 3. izdaja, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2003; 67-77
24. Štrukelj B, Kos J: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007; 143-180
25. PIERCE: *Applications Handbook and Catalog*, 2005/2006; 154-156, 182-195
26. <http://www.veterinarji06.zverinice.com/Kemija/vaje/Elektroforeza.doc> (ogled strani april 2009)
27. Deutscher MP: *Guide to Protein Purifications, Methods in Enzymology, Volume 182*, Academic Press, San Diego, California, ZDA, 1990; 425-439, 679-687
28. Harris ELV, Angal S: *Protein purification methods- a practical approach*, Oxford University Press, New York, 1989; 18-26

29. Hoefler: Protein Electrophoresis, Applications guide, Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, California, ZDA, 1994; 17-52
30. Crowther JR: The ELISA Guidebook, Methods in Molecular Biology, Volume 149, New Jersey, ZDA, 2001; 14-70
31. Sambrook J, Russell DW: Molecular Cloning, A laboratory manual, 3. izdaja, Cold Spring Harbor laboratory press, New York, 2001; A8.52, A9.28
32. www.farma-drustvo.si/gradivo_p/.../PREDAVANJA%202006_2007/Imunogenost%20terapevtskih%20proteinov.doc (ogled strani april 2009)
33. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=5A423056-5056-8A76-4E25-1E5F9C0596B2> (ogled strani april 2009)
34. Johnstone A, Thorpe R: Immunochemistry in practice, Blackwell Scientific Publications, The Alden Press, Oxford, Velika Britanija, 1982; 141-156
35. Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Protein A/G PLUS- Agarose Immunoprecipitation Reagent: sc-2003, Santa Cruz, CA, ZDA
36. Wang L, Colon W: Urea-induced denaturation of apolipoprotein serum amyloid A reveals marginal stability of hexamer. *Prot Scien* 2005; 14: 1811-1817
37. Wang L, Lashuel HA, Walz T, Colon W: Murine apolipoprotein serum amyloid A in solution form a hexamer containing a central channel. *PNAS* 2002; 99 (25): 15947-15952
38. Malle E, Herz R, Artl A, Ibovnik A, Andreae F, Sattler W: Mapping of antigenic determinants of ourified, lipid-free human serum amyloid A. *Scand J Immun* 1998; 48: 557-561
39. Jacobson RH: Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *OIE* 1996; 8-15
40. Fraser CG, Petersen PH: Desirable standards for laboratory tests if they are to fulfill medical needs. *Clin Chem* 1993; 39 (7): 1447-1455
41. Čučnik S, Ambrožič A, Božič B, Skitek M, Kveder T: Anti- β 2-Glycoprotein I ELISA: Methodology, determination of cut-off values in 434 healthy Caucasians and evaluation of monoclonal antibodies as possible international standards. *CCLM* 2000; 38 (8): 777-783

7. PRILOGA

	DIAGNOZA	Datum odvzema	SAA (mg/L)	aSAA ELISA	WB	monomer	dimer	trimer	tetramer
1	SLE	2002	44	2500	+	+	+		
2	SLE	1997	27	21	-				
3	SLE	2003	2	139	-				
4	SLE	1997	15	515	-				
5	SLE	1997	68	995	+	+	+		
6	SLE		129	2222	+	+			
7	SLE		41	99	+	+	+		
8	SLE		56	292	+	+	+	+	
9	SLE	2004	34	1493	+	+	+		
10	SLE	1997	24	812	/				
11	SLE	2004	139	1499	/				
12	SLE	2005	70	2499	/				
13	SLE		221	2203	/				
14	SLE		88	772	/				
1	SLE+aPL		1632	130	-				
2	SLE+aPL	2004	71	2426	+	+	+		
3	SLE+APL	2004	593	176	-				
4	SLE+aPL	2005	657	2063	+		+	+	
5	SLE+aPL	2005	42	2123	+	+	+		
6	SLE+aPL		19	180	-				
7	SLE+aPL	2002	120	1198	+	+	+	+	+
8	SLE+aPL		56	279	+	+			
9	SLE+aPL		106	1443	+	+	+		
10	SLE+aPL		87	1162	/				
11	SLE+aPL	1997	28	2208	/				
12	SLE+aPL	2002	69	680	/				
13	SLE+aPL	2004	155	2709	/				
14	SLE+aPL	2004	39	541	/				
15	SLE+aPL	1998	103	495	/				
16	SLE+aPL		149	1948	/				
17	SLE+aPL	2001	59	1775	/				
18	SLE+aPL		216	581	/				
19	SLE+aPL			1911	/				
20	SLE+aPL			2191	/				
1	PAPS		34	1744	+		+		
2	PAPS	2001	3916	336	+		+		
3	PAPS		56	1074	+	+	+	+	

4	PAPS		78	1767	+			+	
5	PAPS		13	642	+		+	+	
6	PAPS		36	586	+		+		
7	PAPS		38	878	+	+	+		
8	PAPS		16	1616	+	+	+	+	
9	PAPS	2004	46	1304	+	+	+		
10	PAPS	2001	8	586	/				
11	PAPS	2003	20	1068	/				
12	PAPS		26	538	/				
13	PAPS	2002	2	440	/				
14	PAPS	2003	23	423	/				
15	PAPS		10	1085	/				
16	PAPS	2005	76	379	/				
17	PAPS	2001	1	705	/				
18	PAPS	2002	18	1342	/				
19	PAPS	2002	40	643	/				
20	PAPS	2003	61	204	/				
21	PAPS	2004	49	1345	/				
22	PAPS			1472	/				
23	PAPS			1548	/				
1	SAPS	1998	28	1516	+	+			
2	SAPS	2004	287	467	+	+			
3	SAPS	2004	31	214	-				
4	SAPS	2003	25	658	+	+	+	+	
5	SAPS		87	1744	+	+		+	
6	SAPS	2004	33	907	+	+	+	+	
7	SAPS	2002	280	590	+	+	+	+	+
8	SAPS	2004	447	2071	+	+	+		
9	SAPS		360	381	+	+	+		
10	SAPS		77	162	/				
11	SAPS	2004	31	671	/				
12	SAPS	2002	1744	197	/				
13	SAPS	2003	39	687	/				
14	SAPS	2004	727	200	/				
15	SAPS	2005	595	258	/				
16	SAPS		18	209	/				
17	SAPS		94	267	/				
18	SAPS		96	1373	/				
19	SAPS		918	2023	/				
20	SAPS		104	1467	/				
21	SAPS		134	1265	/				
22	SAPS		20	226	/				

23	SAPS	2002	276	1361	/				
24	SAPS	2004	8	1221	/				
25	SAPS		16	944	/				
1	AT		15	123	-				
2	AT	2000	51	402	+		+	+	
3	AT	2000	31	99	+		+	+	
4	AT	2000	26	416	+				+
5	AT	2001	38	1125	+	+	+	+	
6	AT	2000	27	556	+	+	+	+	+
7	AT	2001	58	2299	+	+	+	+	+
8	AT	2001	31	167	+		+		
9	AT	2000	38	2639	+	+			
10	AT	2000	27	954	+	+	+		
11	AT		28	765	+	+	+		
12	AT	2000	45	361	+	+	+		
13	AT	2001	24	47	+		+		
14	AT	2001	24	861	+	+	+		
15	AT	2001	30	578	+	+	+		
16	AT		18	311	+	+	+		
17	AT		10	976	+		+		
18	AT		24	91	+		+		
19	AT		50	757	+		+		
20	AT		23	1030	+	+	+		
21	AT		17	699	+	+	+		
22	AT	2001	12	751	/				
23	AT		40	1900	/				
24	AT		46	1609	/				
25	AT		36	1765	/				
26	AT		12	1722	/				
27	AT		32	1976	/				
28	AT	2001	11	191	/				
29	AT		13	1038	/				
30	AT		42	974	/				
31	AT	2000	31	447	/				
1	VT	2004	32	414	+	+	+		
2	VT		42	425	+	+	+		
3	VT	2004	29	1418	+	+	+		
4	VT		64	120	+	+	+		
5	VT	2004	32	109	+		+		
6	VT	2005	14	3014	+	+	+	+	
7	VT	2005	24	2473	+	+	+	+	
8	VT		36	1494	+	+	+	+	+

9	VT	2005	2414	98	-				
10	VT	2006	760	1303	+	+	+	+	
11	VT	2005	1424	890	+	+	+	+	
12	VT	2005	3310	781	+	+	+	+	
13	VT	2006	1844	2203	+	+	+	+	
14	VT		259	2121	+	+	+	+	
15	VT	2006	347	424	+		+	+	
16	VT	2005	70	574	+	+	+		
17	VT	2006	37	2158	+	+	+		
18	VT	2006	61	631	+	+	+		
19	VT	2005	42	3151	+	+	+		
20	VT	2004	28	639	+	+	+		
21	VT		47	1885	+	+	+	+	
22	VT		32	631	/				
1	N (06)		41	183	+	+	+		
2	N (06)		98	367	+	+	+		
3	N (06)		47	200	+		+	+	
4	N (06)		37	1989	+	+	+	+	
5	N (06)		31	496	+	+	+		
6	N (06)		56	1604	+	+	+		
7	N (06)		31	1618	+	+	+		
8	N (06)		55	714	+	+	+		
9	N (06)		137	49	-				
10	N (06)		42	1503	+	+	+		
11	N (06)		113	2341	+	+	+		
12	N (06)		66	444	+		+	+	
13	N (06)		136	1300	+	+	+		
14	N (06)		75	285	+		+	+	
15	N (06)		65	450	+	+		+	+
16	N (06)			139	+		+		
17	N (06)			624	+		+		
18	N (06)			169	+		+		
19	N (06)			1562	+	+	+		
20	N (06)			1986	+	+	+		
21	N (06)			545	+		+		
22	N (06)			91	+		+		
23	N (06)			45	+		+		
24	N (06)			677	+	+	+		
25	N (06)			77	+	+	+		
26	N (06)			884	+	+	+		
27	N (06)			1083	+	+	+		
28	N (06)			2092	+	+	+	+	

29	N (06)			2436	+	+			
30	N (06)			1129	+	+			
31	N (06)			598	+	+			
32	N (06)			931	+	+			
33	N (06)			701	+	+	+		
34	N (06)			871	+	+	+	+	
35	N (06)			1276	+	+	+	+	
36	N (06)			421	+	+	+		
37	N (06)			1194	+	+	+		
38	N (06)			709	+		+	+	
39	N (06)			677	+		+	+	
40	N (06)			681	+	+	+		
41	N (06)			255	+	+	+		
42	N (06)			930	/				
43	N (06)			412	/				
44	N (06)			2132	/				
45	N (06)			831	/				
46	N (06)			279	/				
47	N (06)			1585	/				
48	N (06)			63	/				
49	N (06)			433	/				
50	N (06)			442	/				
51	N (06)			231	/				
52	N (06)			1211	/				
53	N (06)			1550	/				
54	N (06)			151	/				
55	N (06)			680	/				
56	N (06)			856	/				
57	N (06)			2024	/				
58	N (06)			488	/				
59	N (06)			1993	/				
60	N (06)			193	/				
61	N (06)			318	/				
62	N (06)			806	/				
63	N (06)			822	/				
64	N (06)			151	/				
65	N (06)			2333	/				
66	N (06)			1132	/				
67	N (06)			324	/				
68	N (06)			1352	/				
69	N (06)			181	/				
70	N (06)			1857	/				

71	N (06)			344	/				
72	N (06)			428	/				
73	N (06)			254	/				
74	N (06)			1532	/				
75	N (06)			638	/				
76	N (06)			292	/				
77	N (06)			846	/				
78	N (06)			2441	/				
79	N (06)			2193	/				
80	N (06)			813	/				
81	N (06)			1406	/				
82	N (06)			1203	/				
83	N (06)			1595	/				
84	N (06)			2391	/				
85	N (06)			1966	/				
86	N (06)			192	/				
87	N (06)			82	/				
88	N (06)			3210	/				
89	N (06)			69	/				
90	N (06)			109	/				
91	N (06)			663	/				
92	N (06)			786	/				
93	N (06)			578	/				
94	N (06)			862	/				
95	N (06)			2041	/				
96	N (06)			338	/				
97	N (06)			834	/				
98	N (06)			824	/				
99	N (06)			1246	/				
100	N (06)			1502	/				
101	N (06)			938	/				
102	N (06)			1880	/				
103	N (06)			1408	/				
104	N (06)			624	/				
105	N (06)			1407	/				
106	N (06)			662	/				
107	N (06)			209	/				
108	N (06)			200	/				
109	N (06)			574	/				
110	N (06)			665	/				
111	N (06)			313	/				
112	N (06)			754	/				

113	N (06)			571	/				
114	N (06)			228	/				
115	N (06)			2130	/				
116	N (06)			1739	/				
117	N (06)			2755	/				
118	N (06)			499	/				
119	N (06)			644	/				
120	N (06)			1016	/				
121	N (06)			526	/				
122	N (06)			313	/				
123	N (06)			167	/				
124	N (06)			807	/				
125	N (06)			874	/				
126	N (06)			1043	/				
1	N (03)		136	545	+		+		
2	N (03)		32	800	+		+	+	
3	N (03)		25	568	+		+		
4	N (03)		34	273	-				
5	N (03)		131	936	+	+	+		
6	N (03)		30	396	+	+	+		
7	N (03)		43	758	+	+			
8	N (03)		45	2637	+	+			
9	N (03)			768	+	+	+		
10	N (03)			1838					
11	N (03)			1388					
12	N (03)			2097					
13	N (03)			1534					
14	N (03)			668					
15	N (03)			641					
16	N (03)			404					
17	N (03)			107					
18	N (03)			261					
19	N (03)			718					
20	N (03)			257					
21	N (03)			1640					
22	N (03)			327					
23	N (03)			359					
24	N (03)			1274					
25	N (03)			797					
1	N(96)		11	251	-				
2	N(96)		16	254	+		+		
3	N(96)		15	439	+		+		

4	N(96)		14	332	+		+		
5	N(96)		22	448	+	+	+		
6	N(96)		1	1687	-				
7	N(96)		11	223	+	+	+		
8	N(96)		22	1337	+		+		
9	N(96)		10	1765	+		+		
10	N(96)		17	1928	+		+		
11	N(96)		4	86	-				
12	N(96)		157	2068	+		+		
13	N(96)		6	432	+		+		
14	N(96)		12	178	+			+	
15	N(96)		6	7	-				
16	N(96)	1996	17	125	+		+		
17	N(96)	1996	6	405	-				
18	N(96)	1996	18	107	-				
19	N(96)		38	492	-				
20	N(96)		120	326	-				
21	N(96)		12	2687	+	+	+		
22	N(96)	1996	5	62	-				
23	N(96)		3	464	+	+	+		
24	N(96)		12	1243	+	+			
25	N(96)		1	234	+		+		
26	N(96)		2	1240	+	+	+		
27	N(96)		8	2177	-				
28	N(96)		67	883	+	+	+		