

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA EMERŠIČ

**SERUMSKI AMILOID A KOT AVTOIMUNSKA TARČA PRI VNETNIH
BOLEZNIH**

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA EMERŠIČ

**SERUMSKI AMILOID A KOT AVTOIMUNSKA TARČA PRI VNETNIH
BOLEZNIH**

**SERUM AMYLOID A AS AN AUTOIMMUNE TARGET IN INFLAMMATORY
DISEASES**

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, na Kliničnem oddelku za revmatologijo v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča in somentorstvom doc. dr. Snežne Sodin-Šemrl.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Borutu Božiču, za možnost opravljanja diplomskega dela na področju, ki me veseli ter za strokovne nasvete pri nastajanju tega dela. Iskrena hvala somentorici, doc. dr. Snežni Sodin-Šemrl, za prijazno vodenje skozi eksperimentalno delo in usmerjanje pri pisanju. Posebna zahvala tudi Katji Lakota za uvajanje v laboratorijsko delo, za vse napotke in ker si je vedno vzela čas za odgovarjanje na moja vprašanja. Za izkazano zaupanje in potrpežljivost, predvsem pa ker so bili pripravljene deliti delovne površine s študenti, se zahvaljujem vsem zaposlenim v Laboratoriju za imunologijo revmatizma.

Prav tako se zahvaljujem mojim staršem, ker so mi omogočili študij v Ljubljani in mi vedno stali ob strani. Njim in drugim bližnjim hvala za podporo v trenutkih, ko sem jo najbolj potrebovala.

Naj skromnost besede hvala ne prikrije njenega resničnega pomena.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča in somentorstvom doc. dr. Snežne Sodin-Šemrl.

Ljubljana, 2011

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Janko Kos

Članica diplomske komisije: izr. prof. dr. Irena Mlinarič Raščan

KAZALO

KAZALO	II
POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1. UVOD	1
1.1 SERUMSKI AMILOID A (SAA)	1
1.1.1 Geni in proteini SAA.....	1
1.1.2 Mesta sinteze in funkcije SAA.....	1
1.1.3 SAA kot klinični kazalec.....	4
1.2 AVTOIMUNOST IN AVTOPROTITELESA	5
1.2.1 Avtoimunost.....	5
1.2.2 Naravna avtoimunost in naravna avtoprotitelesa	6
1.2.3 Avtoprotitelesa proti SAA.....	7
1.3 VNETJE : SPREMLJAJOČA KOMPONENTA RAZLIČNIH BOLEZNI	8
1.3.1 Vnetje pri infekcijskih boleznih	8
1.3.2 Vnetje pri avtoimunskih boleznih	9
1.3.3 Vnetje in rakava obolenja.....	10
1.3.4 Vnetje in ateroskleroza.....	11
1.4 METODE V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI VNETJA	11
2. NAMEN DELA	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 Reagenti.....	14
3.1.2 Analizni kompleti.....	15
3.1.3 Pufri in raztopine.....	17
3.1.4 Biološki material	20
3.1.5 Aparature in ostali materiali.....	22

3.2 METODE	24
3.2.1 Encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu	24
3.2.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE).....	28
3.2.3 Prenos po Westernu in imunodetekcija	29
3.2.4 Delo s celičnimi kulturami	30
3.2.5 Določanje koncentracije vnetnih in adhezijskih molekul.....	33
3.2.6 Določanje izražanja tarčnih genov	33
4. EKSPERIMENTALNO DELO	37
4.1 POSKUSI NA CELICAH	37
4.2 POSKUSI ZA UGOTAVLJANJE HIDROLITIČNE FUNKCIJE	38
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	40
5.1 DOLOČANJE IN PRIMERJAVA VREDNOSTI SAA IN PROTITELES PROTI SAA V PRESEČNI ŠTUDIJI	40
5.1.1 Določanje referenčnih vrednosti za SAA in anti-SAA protitelesa.....	40
5.1.2 Vrednosti SAA v posameznih skupinah bolnikov.....	41
5.1.3 Nivoji anti-SAA protiteles v posameznih skupinah bolnikov	44
5.2 LONGITUDINALNO SPREMLJANJE RAVNI SAA IN PROTITELES PROTI SAA	48
5.2.1 Primerjava vrednosti SAA in anti-SAA protiteles pred pričetkom zdravljenja	48
5.2.2 Ravni SAA in anti-SAA protiteles pri bolnikih z zgodnjim RA	51
5.2.3 Določanje korelacije med SAA in aktivnostjo bolezni zgodnjega RA	58
5.3 MOŽNE FIZIOLOŠKE FUNKCIJE PROTITELES PROTI SAA	61
5.3.1 Ugotovitve pri poskusih na celicah	61
5.3.2 Ugotovitve pri poliakrilamidni gelski elektroforezi ob sočasni inkubaciji SAA in IgG	64
6. SKLEP	67
7. LITERATURA	68

POVZETEK

Vnetje je življenjsko pomemben obrambni mehanizem preko katerega imunski sistem vzdržuje integriteto organizma, vseeno pa se v zadnjih desetletjih vse bolj poudarja tudi vpletenost vnetja v nastanek in razvoj različnih bolezni. Za prepoznavanje vnetnih stanj se v rutinskih preiskavah najpogosteje določata C-reaktivni protein (CRP) in hitrost sedimentacije eritrocitov, medtem ko se serumski amiloid A (SAA) kot pokazatelj vnetja še ni uveljavil. Nedolgo nazaj so odkrili tudi prisotnost protiteles proti SAA pri večini zdravih krvodajalcev, kar sproža ugibanja o njihovi vlogi v organizmu. Zato je bil glavni namen našega dela določanje in primerjanje ravni SAA in protiteles proti SAA pri bolnikih z različnimi vnetnimi boleznimi.

V presečni študiji smo primerjali skupine bolnikov z bakterijsko ($n = 30$) in virusno ($n = 20$) infekcijo, s srčno-žilnimi obolenji ($n = 26$), rakom ($n = 18$) in zgodnjim revmatoidnim artritisom ($n = 12$) ter ugotovili, da so središčne vrednosti za SAA najvišje pri kroničnih vnetnih boleznih (od 90 do 292 mg/l). Hkrati smo le pri teh boleznih določili prisotnost anti-SAA protiteles nad postavljeno fiziološko mejo, zato je možno, da šele dolgotrajno povišane vrednosti SAA privedejo do sprememb v nivoju anti-SAA protiteles. V primerjavi z zdravimi krvodajalci smo značilno odstopanje v ravneh anti-SAA protiteles potrdili le pri bolnikih s srčno-žilnimi boleznimi. S spremljanjem bolnikov z zgodnjim neopredeljenim artritisom skozi daljše obdobje smo ugotovili, da se visoki začetni nivoji SAA pojavljajo izključno pri tistih bolnikih, ki pozneje razvijejo revmatoidni artritis. Vrednost SAA, določena pred pričetkom zdravljenja, bi zato lahko bila dodaten kriterij, na podlagi katerega bi bila možna zgodnejša postavitev diagnoze revmatoidnega artritisa. Ker je v zgodnjem obdobju vnetnega artritisa moč doseči remisijo bolezni, bi s tem pripomogli h kvalitetnejši obravnavi bolnikov. Pri bolnikih z zgodnjim revmatoidnim artritisom smo močno povišane začetne vrednosti SAA (nad 800 mg/l) najpogosteje določili pri tistih, ki imajo večjo verjetnost za težji potek bolezni. Ugotovili smo, da SAA lahko služi za spremljanje zgodnjega revmatoidnega artritisa, z nadaljevanjem prospektivne študije pa bomo pridobili tudi odgovor, ali in kako dobro vrednosti SAA korelirajo z aktivnostjo te bolezni. Povezave med nivoji SAA in anti-SAA protiteles nismo potrdili ne v presečni ne v longitudinalni študiji. Tudi za razjasnitev vloge anti-SAA protiteles bodo potrebne nadaljnje raziskave, v vsakem primeru pa bo izolacija teh protiteles iz seruma zdravih ljudi in bolnikov pomemben naslednji korak.

ABSTRACT

Inflammation is an ancient defence mechanism against trauma, injury or infection. Acute inflammation has beneficial effects and maintains the integrity of the organism, while studies in recent decades have suggested an implication of chronic inflammation in the pathogenesis of various diseases. Quantitative determination of C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate are two of the most commonly used tests in the assessment of inflammation. Like CRP, serum amyloid A (SAA) is also a highly responsive acute phase protein. Even though some studies found SAA levels to be more optimal as compared to CRP, SAA is not routinely used as an inflammatory marker. Just recently, the presence of autoantibodies against SAA in healthy blood donors has been indicated, leading to speculations about their physiological roles. The main objective of our work was to determine the levels of SAA antigen and autoantibodies against SAA in sera of patients with inflammatory diseases.

In a cross-sectional study we compared groups of patients with bacterial (n = 30) and viral (n = 20) infections, cardiovascular disease (n = 26), cancer (n = 18) and early rheumatoid arthritis (n = 12). We observed the highest median values of SAA in patients with chronic inflammatory conditions (from 90 up to 292 mg/l). Compared to healthy blood donors significantly lower levels of anti-SAA antibodies were obtained only in cardiovascular patients. In a longitudinal study patients with early undifferentiated arthritis were followed. Very high initial levels of SAA occurred exclusively in patients who later developed rheumatoid arthritis. The value of SAA determined prior to treatment could therefore be an additional criterion for predicting rheumatoid arthritis risk. It could also help physicians to an earlier diagnosis. Since early inflammatory arthritis is a critical period, during which prescribed therapy may have a durable effect, this would improve the quality of long-term treatment as well. In patients with early rheumatoid arthritis extremely high initial levels of SAA (over 800 mg/l) were mainly found in patients at greater risk for severe disease course. We indicate that SAA can be used for monitoring early rheumatoid arthritis. With continued prospective research we will also be able to tell whether and how well SAA correlates with disease activity. No correlation between SAA and anti-SAA antibody levels was found, neither in cross-sectional nor in the longitudinal study. Further investigation is needed in order to elucidate the precise role of anti-SAA antibodies. So, their isolation from healthy blood donors' and patients' sera could be the next obvious step.

SEZNAM OKRAJŠAV

AA, SAA	amiloid A, serumski amiloid A
anti-CCP protitelesa	protitelesa proti citruliniranim peptidom
anti-SAA protitelesa	protitelesa proti serumskemu amiloidu A
BS	število bolečih sklepov
BSA	goveji serumski albumin (bovine serum albumin)
cDNA	komplementarna DNA
CRP	C-reaktivni protein
DAS	lestvica aktivnosti bolezni (disease activity score)
DEA pufer	dietanolaminski pufer (pH=9,8)
ELISA	encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu
ESR	hitrost sedimentacije eritrocitov
FBS	serum govejega ploda (fetal bovine serum)
HCAEC	človeške endotelijske celice koronarne arterije
HDL, LDL, VLDL	lipoproteini visoke, nizke, zelo nizke gostote
HRP	hrenova peroksidaza
IgG (M)	imunoglobulin G (M)
IL-6 (8, 1 β)	interlevkin-6 (8, 1 β)
MIP-3 α (1 α)	makrofagni vnetni protein (macrophage inflammatory protein)
mRNA	informacijska RNA
NAbs	naravna avtoprotitelesa
NC	nitrocelulozna
OS	število otečenih sklepov
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	s fosfatnim pufrom pufrana slanica (pH=7,4)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RA, RF	revmatoidni artritis, revmatoidni faktor
SDS	natrijev dodecilsulfat
SLE	sistemski eritematozni lupus
TBS	s Trisom® pufrana slanica (pH=7,4)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze α
WB	prenos po Westernu

1. UVOD

1.1 SERUMSKI AMILOID A (SAA)

1.1.1 Geni in proteini SAA

Serumski amiloid A (SAA) je ime za skupino majhnih, 12-14 kDa velikih, apolipoproteinov, ki se sintetizirajo predvsem v jetrih. Njihova aminokislinska zaporedja so evolucijsko visoko ohranjena, kar nakazuje pomembno biološko vlogo teh proteinov. Pri človeku so do sedaj opisani 3 genski produkti, čeprav obstajajo 4 geni, ki kodirajo SAA in so locirani na kratki ročici 11. kromosoma [1,2]. Vsem je skupna genomska organizacija, sicer značilna za gene mnogih apolipoproteinov: 4 eksoni (kodirajoča zaporedja) in 3 introni (nekodirajoča zaporedja). Glede na pripadajoče gene in glede na plazemske koncentracije med odzivom akutne faze vnetja, lahko proteine SAA razdelimo v dva razreda. V prvega sodita proteina, ki sta enaka v več kot 90% aminokislinskega zaporedja. Zapis zanj nosita gena *SAA1* in *SAA2*; prepisovanje obeh je inducirano ob vnetnih stanjih, pri čemer sta za večjo indukcijo prepisovanja odgovorna zlasti IL-1 β in TNF α , IL-6 pa v kombinaciji z IL-1 β , kjer ima sinergistični učinek [2,3]. Indukcija transkripcije, hkrati pa tudi povečana stabilnost molekul mRNA, vodita v povišane plazemske koncentracije proteinov, ki ju zato označujemo kot serumski amiloid A akutne faze (A-SAA). To je obenem tudi primer enega najhitrejših in najbolj odzivnih sistemov povišanja proteinskih nivojev v krvi. Drugi razred predstavlja konstitutivni serumski amiloid A (C-SAA), ki ga pri človeku kodira gen *SAA4* in katerega plazemske koncentracije med akutno fazo ostajajo praktično nespremenjene. Njegovo aminokislinsko zaporedje je le v 53% oz. 55% podobno zaporedju proteina SAA1 oz. SAA2. Razen pri človeku je C-SAA poznan le še pri miši. Gen *SAA3* je do nedavnega veljal za psevdogen, saj vrinjen nukleotid v eksonu 3 povzroči premik bralnega okvirja, s tem pa nastop stop signala že na kodonu 43 [2]; vseeno so v *in vitro* študiji na celičnih linijah ugotovili, da se gen *SAA3* izraža v človeških epiteljskih celicah mlečnih žlez po njihovi inkubaciji s prolaktinom ali lipopolisaharidom [3].

1.1.2 Mesta sinteze in funkcije SAA

Jetra so glavno, ne pa tudi edino mesto sinteze SAA. Izven jeter se sintetizirata tako akutno fazni kot konstitutivni SAA. Njunjo prisotnost so dokazali v celicah aterosklerotičnih lezij (t.j. v endotelijskih celicah, makrofagih, gladkomišičnih celicah, penastih celicah), v

adipocitih, v sinovijskem tkivu bolnikov z revmatoidnim artritisom (v sinoviocitih in infiltriranih makrofagih) ter v številnih histološko normalnih tkivih (zlasti v epiteliju želodca, vranice, ščitnice, kože in drugih organov) [2-4]. V sinoviji bolnikov z osteoartritisom je prisoten le C-SAA, se pa A-SAA pri teh bolnikih sintetizira v hrustančevini oz. hondrocitih. A-SAA naj bi nastajal tudi v možganih (mielinskih ovojnica, aksonskih membranah) bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo [3]. Nedavno so pokazali znotrajcelično kolokalizacijo SAA z mikrotubuli, prav tako prisotnost nevezanega SAA v citosolu, jedru in nanotubulih [5].

Ali ima lokalno sintetiziran SAA kakšno posebno, od jetrnega SAA različno vlogo, še ni znano. A-SAA, ki nastaja v normalnih celicah in tkivih, bi lahko deloval kot lokalna zaščitna molekula. Med časom, ki je potreben, da se preko citokinske kaskade oblikuje sistemski odziv ter znotraj tega povečana jetrna sinteza akutno-faznih proteinov (vključno z A-SAA), naj bi namreč omogočal takojšnjo obrambo pred dejavniki, ki izzovejo lokalno vnetno reakcijo [2]. Prav tako so že dokazali, da je A-SAA prekurzor amiloida A (AA), glavne sestavine sekundarnih amiloidnih depozitov. Sekundarna ali reaktivna amiloidoza je resen zaplet pri bolnikih s kroničnim ali ponavljajočim se vnetjem, saj lahko netopni fibrilarni agregati, ki se odlagajo v različnih tkivih, povzročijo okvaro ali celo odpoved organov (najpogosteje ledvic) [2,6]. Fibrile amiloida A predstavljajo N-terminalni peptid A-SAA in nastajajo s proteolitično cepitvijo, ki jo lahko katalizirajo številne serumske in celične proteaze – elastaze, kolagenaze, serumske serinske proteaze, katepsin B in druge [2]. Nobena od človeških izoform SAA ni prednostna oz. bolj dovzetna za hidrolitično pretvorbo v AA. Ekstrahepatični A-SAA bi zato lahko predstavljal dodatni vir amiloida A, poleg tega pa naj bi lokalno nastali AA delovali tudi kot amiloidno fibrilno jedro, ki kot tako spodbudi nastajanje novih fibril iz sistema A-SAA [3]. Ob tem so trajno povišane plazemske koncentracije A-SAA še vedno nujen, a nezadosten pogoj. Ker se sekundarna amiloidoza ne pojavlja pri vseh kroničnih vnetnih stanjih, je namreč očitno, da so v patogenezo te bolezni vpleteni še drugi dejavniki (okolja, genetski) [6].

Kadar je vezan na delce HDL, je A-SAA zaščiten pred delovanjem serumskih proteaz. Je glavni apolipoprotein v HDL v akutni fazi; nanj se veže takoj po sprostitvi v krvni obtok in pri tem izpodriva apolipoprotein A1, ki je sicer prevladujoč apolipoprotein v teh delcih [1,2]. Kadar HDL ni na voljo, je možna tudi vezava na druge lipoproteine (LDL, VLDL) [7]. A-SAA-HDL kompleksom oz. A-SAA pripisujejo različne vloge. Sodeloval naj bi pri modulaciji imunskega odziva, se vpletal v metabolizem in transport lipidov ter deloval

(proti)vnetno. Celice imunskega sistema (monocite, limfocite T) spodbuja k izločanju vnetnih citokinov in ima zatorej tudi sam citokinom podobne lastnosti. Učinke posreduje preko različnih receptorjev; vezal naj bi se npr. na iste receptorje kot kemoatraktanti (N-formil-metionil-levcil-fenilalanin) in kemokini [2]. Na ta način privablja nove vnetne celice (monocite, mastocite, limfocite T) v vnetišče, spodbuja njihovo adhezijo in infiltracijo. Hkrati inducira encime (kolagenaze, matriksne metaloproteinaze, stromelizin), ki so odgovorni za razgradnjo zunajceličnega matriksa in zato pomembni v popravljalnih mehanizmih po poškodbi tkiva. Čeprav lokalno spodbuja vnetje in s tem odstranitev vzroka ter umiritev vnetja, so opisani tudi nekateri protivnetni učinki A-SAA. Ti so verjetno odvisni od koncentracije na mestu delovanja in so zato selektivni in specifični, bolj kot sistemski. A-SAA zavira agregacijo trombocitov, ki so skupaj s citokini, ki jih sproščajo po aktivaciji, vpleteni v vnetne in trombotične procese. Ker se veže na nevtrofilce, naj bi preprečeval tudi oksidativni izbruh in s tem oksidativno poškodbo tkiva med vnetjem [1,2,8].

Vpletanje A-SAA v transport in metabolizem lipidov ima pomembne posledice za organizem. Vezava A-SAA na HDL spremeni presnovo HDL in tudi njegovo funkcijo v reverznem transportu holesterola. Iz zaščitnega HDL, ki preprečuje oksidacijo LDL, naj bi tako nastajal pro-aterogen fenotip tega lipoproteina. Akutno-fazni HDL po eni strani omogoča dostavo holesterola celicam na periferiji, ki imajo povečane potrebe po holesterolu (na ta način je spodbujena obnova tkiva na mestu vnetja), po drugi strani pa naj bi olajšal tudi odstranjevanje velikih količin holesterola, ki se sproščajo ob poškodbi tkiva [1,2,8]. Ugotovili so, da imajo A-SAA-HDL delci v primerjavi s HDL manjšo afiniteto do hepatocitov. Vezava A-SAA na holesterol naj bi spodbudila njegov privzem v celice, poleg tega A-SAA vpliva na encime, vključene v metabolizem holesterola. Ker spodbuja biosintezo številnih mediatorjev vnetja, npr. prostaglandinov in tromboksanov, naj bi bil vpleten v patogenezo ateroskleroze [2,8]. Na možno vzročno povezavo med povišanimi vrednostmi A-SAA in aterosklerozo nakazujejo tudi epidemiološke študije – kronična vnetna stanja (npr. revmatoidni artritis) namreč spremlja pospešena ateroskleroza in s tem povišano tveganje za razvoj kardiovaskularnih bolezni, ki ga ni moč razložiti s klasičnimi dejavniki tveganja (npr. hipertenzija, dislipidemija, kajenje). Dosedanje presečne študije sicer še niso potrdile neposredne in znatne povezave med sistemskimi vrednostmi A-SAA in aterosklerozo, a to ne izključuje možnih pro-aterogenih učinkov lokalno (v žilni steni) sintetiziranega A-SAA [7, 9].

Tudi z revmatoidnim artritisom (RA) je A-SAA vzročno povezan. Kronično povišane plazemske koncentracije sistemskega A-SAA, vključno z A-SAA, ki nastaja lokalno v sinoviocitih, namreč vodijo v dolgotrajno povečano produkcijo proteolitičnih encimov (predvsem matriks metaloproteinaz), kar povzroči/pripomore k razgradnji hrustanca in okvari sklepov [4]. Z A-SAA izzvana produkcija matriks metaloproteinaz in posledična razgradnja ekstracelularnega matriksa je povezana tudi z napredovanjem, invazivnostjo in metastaziranjem tumorjev. Sposobnosti vezave na ekstracelularni matriks in spreminjanje le-tega naj bi bili tako ključni za vpletenost A-SAA v kancerogenezo. A-SAA bi zato lahko bil ena od molekul, ki povezujejo kronično vnetje in neoplazije [10].

1.1.3 SAA kot klinični kazalec

Kljub negativnim posledicam trajno povišanih plazemskih koncentracij (nevarnost za razvoj amiloidoze, degenerativnih bolezni, ateroskleroze), je prehodno zvišanje A-SAA za organizem koristno. Da ima v prvi vrsti zaščitno vlogo, potrjuje ne le dejstvo, da se je v evoluciji ohranil v skoraj nespremenjeni obliki, pač pa tudi, da je njegova ekspresija v stresnih razmerah (vnetna oz. življenjsko ogrožajoča stanja) znatno povišana pri vseh vretenčarjih [1,2]. Tako je tudi pri človeku A-SAA skupaj s C-reaktivnim proteinom (CRP) najpomembnejši pozitivni reaktant akutne faze vnetja [7,11,12]. Njegove plazemske koncentracije se lahko ob vnetju, pri bakterijskih in glivičnih infekcijah, poškodbi tkiva, neoplazijah in revmatoidnem artritisu povišajo tudi do 1000-krat in presežejo vrednost 1000 mg/l. Zmerno povišanje koncentracij (do 100 mg/l) je pogosto opaženo tudi pri virusnih infekcijah in sistemske eritematoznem lupusu (SLE) [7].

Ker je pri CRP in SAA povišanje koncentracij med akutno fazo hitro, prehodno in izrazito, odražata dejanski časovni potek vnetja, omogočata razlikovanje med vnetnimi in ne-vnetnimi stanji in sta (ker zgodaj odražata tudi odziv na predpisano terapijo ali potrebo po spremembi zdravljenja) uporabna pri spremljanju vnetnih bolezni [11,13]. Medtem ko je CRP že standardiziran in se uporablja v rutinskih preiskavah kot vnetni kazalec, se mora SAA kot tak šele uveljaviti. Do sedaj opravljene študije namreč nakazujejo, da bi lahko bil SAA občutljivejši in hitreje odziven ter zato bolj optimalen pokazatelj vnetja pri določenih boleznih, kjer povišanje plazemskih nivojev CRP ni nujno prisotno – npr. pri SLE, nekaterih virusnih infekcijah, primarnem Sjögrenovem sindromu [12,14,15]. V primerjavi s CRP in hitrostjo sedimentacije eritrocitov (ESR) naj bi SAA tudi najboljše koreliral s kazalci aktivnosti bolezni pri bolnikih z revmatoidnim artritisom. Zato je verjetno

najprimernejši dostopni kazalec za spremljanje poteka in ocenjevanje aktivnosti te bolezni [16]. Povišane vrednosti A-SAA spremljajo številna kronična vnetna stanja, tudi aterosklerozo. Ne samo, da kronično povišanje koncentracij A-SAA napoveduje tveganje za kardiovaskularne dogodke [17], pokazali so tudi, da je lahko A-SAA neodvisen napovedovalec smrtnosti ob akutnih miokardnih infarktih [18].

1.2 AVTOIMUNOST IN AVTOPROTITELESA

1.2.1 Avtoimunost

Avtoimunost je imunski odziv proti telesu lastnim sestavinam in je posledica porušnja mehanizmov, ki normalno vzdržujejo toleranco (neodzivnost) do lastnega. Toleranca do lastnih antigenov nastane in se vzdržuje na različne načine – z delecijo, zakrnelostjo ali indukcijo anergije (neodzivnosti) avtoreaktivnega kлона, pa tudi z mehanizmi kot so sekvestracija in neizražanje avtoantigenov. Vzrok za avtoimunski odziv je zato lahko tako v spremenjenem lastnem tkivu kot tudi v spremenjenem imunskem odzivu (preglednica I) [19,20].

Preglednica I: Možni vzroki za avtoimunski odziv. Ag-antigen/i, APC-antigen predstavitevna celica.

SPREMEMBE TKIVA	SPREMEMBE V IMUNSKEM ODZIVU
↓ okvara/vnetje	↓ neuspešna toleranca
1) sproščanje skritih lastnih Ag 2) strukturne spremembe lastnih Ag 3) povečano izražanje kostimulatorjev na tkivnih APC	1) abnormalna selekcija limfocitnih klonov 2) poliklonska aktivacija anergičnih limfocitov 3) spodbujanje s tujimi, navzkrižno reaktivnimi Ag 4) porušeno citokinsko ravnovesje

Ker je oblikovanje antigenskega vezišča protiteles oz. preurejanje genov za imunoglobuline (Ig) naključen proces, obstaja možnost za avtoimunski odziv pri vsakem posamezniku. Ne glede na to, so avtoimunske bolezni redke. Na njihov razvoj vplivajo številni dejavniki – ne le nepravilnosti v delovanju imunskega sistema in lokalne spremembe tkiva, pač pa tudi bakterijske infekcije in genetski dejavniki, ki predisponirajo k avtoimunosti. Vsak avtoimunski odziv zato še ne vodi v bolezen. Avtoimunske bolezni nastanejo šele, ko avtoimunske reakcije povzročijo patološke poškodbe tkiva. Do teh lahko pride preko različnih mehanizmov – zaradi delovanja krožečih avtoprotiteles na tkiva, nastajanja imunskih kompleksov in/ali aktivacije avtoreaktivnih limfocitov T. Kadar pride do prekinitve tolerance za en antigen ali manjše število tkivnih antigenov, so poškodbe

tkiva omejene v glavnem na en organ – v tem primeru govorimo o organsko specifičnih avtoimunskih boleznih. Pri sistemskih avtoimunskih boleznih, kot sta npr. SLE in RA, pa je imunski sistem usmerjen proti številnim, tkivno nespecifičnim antigenom (npr. DNA, sestavinam citoplazme), zaradi česar je prizadetih več tkiv in organov [19]. Diagnostika avtoimunskih bolezni velikokrat temelji na detekciji specifičnih (patoloških) avtoprotiteles, ki imajo lahko poleg diagnostične tudi napovedno vrednost. Mnoga izmed njih je namreč moč detektirati še preden se avtoimunska bolezen pojavi in zatorej napovedujejo tveganje za razvoj bolezni [21].

1.2.2 Naravna avtoimunost in naravna avtoprotitelesa

Pri kroničnih avtoimunskih in drugih boleznih lahko v serumu bolnikov potrdimo prisotnost številnih avtoprotiteles, katerih patogenosti ni moč dokazati [19]. Do ugotovitve, da so takšna avtoprotitelesa lahko prisotna tudi pri zdravih posameznikih, naj bi prišli že pred več kot 100 leti, vendar se je šele v 90. letih prejšnjega stoletja zbralo dovolj dokazov o njihovem obstoju [22]. Ker so prisotna v serumu zdravih ljudi in nastajajo brez specifične imunizacije oz. obstajajo neodvisno od izpostavljenosti tujim antigenom, so jih poimenovali »naravna avtoprotitelesa« (»natural autoantibodies« ali NAbs). Postalo je jasno, da je avtoimunost do neke mere vgrajena v imunski sistem in da je določena stopnja avtoimunosti fiziološka (»naravna avtoimunost«) [23, 24]. Sprva so menili, da so naravna protitelesa polireaktivne, šibko afinitetne molekule IgM, a se je izkazalo, da so lahko tudi monospecifična in da jih skoraj polovica pripada IgG razredu [22]. Predvidevajo, da bi lahko pri zdravem človeku več kot polovica IgG izkazovala afiniteto do lastnih antigenov. Repertoar NAbs je znotraj vrste in tudi med različnimi vrstami zelo podoben. Evolucijska ohranjenost kaže na verjetno pomembno vlogo mreže teh krožečih protiteles pri vzdrževanju homeostaze organizma. Ker nekatera NAbs izkazujejo afiniteto do avtoantigenov, ki so tarča tudi pri avtoimunskih boleznih (hormoni, DNA, histoni, mielinski bazični protein in drugi) in se od patoloških avtoprotiteles razlikujejo le v količini in v fini specifičnosti, je možno, da se ravno iz teh NAbs razvijejo patogeni avtoprotitelesa. Zakaj pride do tega odklona, ni povsem jasno – lahko da sprememba avtoantigena izzove drugačen imunski odziv, lahko je avtoantigen neobičajno predstavljen avtoreaktivni celici T ali pa so v ozadju oksidativni procesi [12, 23].

Tveganje za razvoj avtoimunske bolezni se zdi visoka cena za obstoj NAbs in ta se po vsej verjetnosti ne bi ohranila, če ne bi bilo vzdrževanje mreže NAbs tudi koristno. NAbs naj bi

zato izpolnjevala številne naloge. Sodelovala naj bi pri odstranjevanju odpadnih snovi (spremenjenih/ nefunkcionalnih molekul) in omogočala zgodnje prepoznavanje patogenov, s katerimi se organizem še ni srečal; ker so večinoma polireaktivna, lahko namreč prepoznajo različne patogene, katerih antigeni so navzkrižno reaktivni z določenimi avtoantigeni. Primer je zgodnji imunski odziv na bakterijske proteine vročinskega šoka («heat-shock proteins» ali HSP), ki so v veliki meri podobni človeškemu proteinu vročinskega šoka (molekulska mimikrija). Četudi so NAbs večinoma nizkoafinitetna, naj bi v tem pogledu omogočala zadostno obrambo pred patogenom, dokler se ne oblikuje specifičen imunski odziv. Prav tako naj bi blokirala antigenske determinante avtoantigenov in tako preprečevala, da bi avtoreaktivni kloni nanje burno odreagirali – na ta način torej ščitijo pred patološkim avtoimunskim odzivom [23,24]. Pripisujejo jim tudi vlogo v transportu molekul do specifičnih vezavnih mest; s tem naj bi ligande po eni strani zaščitila pred proteolizo, po drugi pa preprečila njihovo nespecifično vezavo [22]. Ker (avtoimunske) bolezni spremljajo kvantitativni odkloni v mreži NAbs, bi lahko z detekcijo teh odstopanj v bodoče ločevali med fiziološkim in patološkim stanjem organizma. Možno je tudi, da so določene spremembe v repertoarju NAbs značilne za specifično avtoimunsko bolezen, kar pomeni, da bi lahko imele napovedno (že pred klinično manifestacijo bolezni) in diagnostično vrednost [22,23,25]. Izključena ni niti terapevtska uporabnost NAbs – ker pospešujejo odstranjevanje spremenjenih proteinov iz telesa, so že predlagali npr. uporabo človeškega monoklonskega protitelesa proti amiloidu A β v terapiji Alzheimerjeve bolezni [12,15].

1.2.3 Avtoprotitelesa proti SAA

V serumu bolnikov z različnimi vnetnimi boleznimi (avtoimunske, kardiovaskularne, rak) lahko dokažemo prisotnost avtoprotiteles proti mnogim akutno faznim proteinom. Zaradi kroničnega vnetja je namreč imunski sistem dlje časa v stanju, ko so ko-stimulatorski signali okrepljeni in je predstavljanje antigenov pogostejše. Tako lahko lastne, nekoliko spremenjene antigene imunski sistem hitro spozna kot tuje. Vnetje hkrati botruje tudi spremembam v lastnih molekulah – izpostavijo se lahko novi (prej skriti) epitopi [15].

O obstoju protiteles proti poglavitnemu akutno-faznemu proteinu – SAA sta leta 2004 prva poročala Rosenau in Schur [26]. Povišane vrednosti anti-SAA protiteles sta odkrila predvsem pri bolnikih s kardiovaskularnimi boleznimi (s stenozo aorte, globoko vensko trombozo, atrijsko fibrilacijo), ne pa pri krvodajalcih, vendar so bile slabost te študije

majhne skupine bolnikov. Ker nista uspela dokazati inhibicije SAA z anti-SAA protitelesi v raztopini, sta sklepala, da protitelesa niso usmerjena proti nativni obliki proteina in da se šele z vezavo SAA na (negativno nabito) površino izpostavijo neoepitopi, ki jih protitelesa lahko prepoznajo; podobno naj bi veljalo tudi za protitelesa proti CRP [26]. Nasprotno so leta 2009 Lakota in sodelavci [12] poročali o prisotnosti anti-SAA protiteles pri 98% testiranih zdravih krvodajalcev. Testirali so serume 219 krvodajalcev in 227 bolnikov. V skupini bolnikov s trombozami je bilo 95% bolnikov pozitivnih na anti-SAA protitelesa, medtem ko je bilo v skupini z avtoimunskimi boleznimi takih bolnikov 67-83%. Nivoji anti-SAA protiteles so bili približno enaki v vseh skupinah (bolniki, krvodajalci), razen v skupini bolnikov z arterijskimi trombozami, v kateri so opazili znatno znižane nivoje protiteles v serumu. Prav tako so pokazali vezavo anti-SAA protiteles na SAA v raztopini; protitelesa so prepoznala monomere, dimere in multimere SAA. Na podlagi teh rezultatov je bila upravičena predpostavka, da so anti-SAA protitelesa najverjetneje del repertoarja NAbs. Je pa res, da ugotovljena visoka avidnost teh protiteles in razred IgG za NAbs nista zelo značilna. Vprašanje o naravni prisotnosti in morebitni fiziološki vlogi anti-SAA protiteles tako ostaja odprto. Če anti-SAA protitelesa sodelujejo pri odstranjevanju SAA in tako pripomorejo k razrešitvi akutne faze, bi ob znižanih nivojih teh protiteles v serumu pričakovali povišane vrednosti SAA [12]. Kljub temu pa do sedaj opravljene presečne študije niso pokazale nobene korelacije med tem antigenom in protitelesom [12,26].

1.3 VNETJE : SPREMLJAJOČA KOMPONENTA RAZLIČNIH BOLEZNI

Vnetje je reakcija celic, tkiv in organizma kot celote na različne poškodbe. Izzovejo ga lahko biološki, kemični, fizikalni ali imunski dejavniki, njegov nastanek, razvoj in zaključek pa uravnavajo številni mediatorji vnetja. Ker ti mediatorji večinoma nastopajo tudi kot mediatorji v uravnavanju imunskega odziva, sta lahko oba mehanizma tesno prepletena in kot taka vzdržujeta integriteto organizma – omogočata npr. celjenje ran, zaščito pred patogeni, regeneracijo tkiv, odstranjevanje odpadnih snovi. Ker lahko vnetje, podobno kot mnogi drugi dobronamerni mehanizmi, tudi samo povzroči škodo, je nujno, da je časovno omejeno in natančno uravnano [20,24].

1.3.1 Vnetje pri infekcijskih boleznih

Vnetje pomembno prispeva k odstranjevanju mikroorganizmov; brez vnetja ni obrambe pred infekcijo. Vdor mikroorganizma skozi kožo ali sluznice povzroči tkivno okvaro, ki ji

sledi lokalni vnetni odziv: poveča se dotok krvi v tkivo, povečana prepustnost kapilar omogoči prehod zaščitnih molekul (protiteles, proteinov komplementa) iz žil v tkivo, vnetni mediatorji pa povzročijo kopičenje vnetnih celic in njihovo aktivacijo. Spremembe žilja, ki se pojavijo zgodaj pri *akutnem vnetju*, nastanejo zaradi histamina (sprošča iz aktiviranih tkivnih bazofilcev), zaradi neposrednega učinka plazemskih encimskih mediatorjev (npr. bradikinina in fibrinopeptidov) in zaradi posrednega delovanja komplementnih anafilatoksinov (C3a, C4a, C5a); komplement se lahko namreč aktivira z antigeni na površini mikroba, še preden se proti njim proizvedejo specifična protitelesa (alternativna pot aktivacije). Nevtrofilci, ki potujejo iz krvnih žil v prizadeto območje, fagocitirajo patogene mikrobe in sproščajo mediatorje, ki prispevajo k vnetju – npr. kemokina MIP-1 α in MIP-1 β (makrofagna vnetna proteina), ki v vnetišče privabljata makrofage. Tudi aktivirani makrofagi učinkovito fagocitirajo mikrobe in izločajo citokine (npr. TNF- α , IL-1, IL-6), ki povzročajo številne lokalne in sistemske spremembe (odziv akutne faze) [19]. Povečana koncentracija mediatorjev, ki pospešujejo vnetje, praviloma izzove tvorbo drugih mediatorjev, ki vnetje zavrejo takoj, ko izgine primarni razlog za njegov nastanek – v primeru infekcije torej takrat, ko je mikrob odstranjen. Kadar imunski mehanizmi niso zmožni povsem odstraniti povzročitelja, akutnemu vnetju sledi *kronično vnetje*. Pojavi se lahko tudi zaradi zaporednih tkivnih okužb ali brez prehodnega akutnega vnetja, kot se to dogaja npr. pri okužbah z znotrajceličnimi mikrobi (mikobakterije, virusi), ki razmeroma malo okvarijo tkivo [19, 20].

1.3.2 Vnetje pri avtoimunskih boleznih

Kronično vnetje je značilno tudi za avtoimunske bolezni, kjer lastni antigeni neprestano aktivirajo celice T. Vzdrževanje kroničnega vnetja omogoča medsebojno sodelovanje makrofagov in celic T pomagalk. Celice T pomagalk (T_H1) izločajo citokin interferon- γ , ki spodbuja aktivacijo makrofagov, citotoksičnost naravnih celic ubijalk in diferenciacijo celic B ter hkrati zavira razmnoževanje celic T_H2. Kronično aktivirani makrofagi pa sproščajo citokine (npr. TNF- α), ki spodbujajo razmnoževanje fibroblastov, ter hidrolitične encime in reaktivne presnovke, ki doprinesejo k trajni poškodbi tkiva. Poleg avtoreaktivnih limfocitov T in aktiviranih makrofagov lahko poškodbe izzovejo tudi nastali imunski kompleksi (odlagajo se kot depoziti, aktivirajo komplement) in učinki avtoprotiteles na tkiva [19]. Dober primer kronične vnetne avtoimunske bolezni je *revmatoidni artritis*, pri katerem so prve vnetne spremembe navadno opazne na malih sklepih v zapestju in prstih.

K razvoju okvare prispevata tako protitelesno kot celično posredovana imunost. V vneti sinovijski membrani so prisotne celice T_H , aktivirane celice B, plazmatke, nevtrofilci in makrofagi. V njej so tudi številni citokini in kemokini (npr. IL-1, IL-8, TNF- α , interferon- γ), ki aktivirajo sinoviocite, da izdelujejo hidrolitične encime (npr. kolagenazo, matriksne metaloproteinaze), ti pa povzročijo razgradnjo hrustanca, vezi in kit. Prav tako se v sklepkih odlagajo kompleksi revmatoidnega faktorja (RF) in IgG, ki sprožajo različne vnetne procese (preobčutljivostne reakcije tipa III), kar vodi v kronično vnetje sklepov [19-21].

1.3.3 Vnetje in rakava obolenja

Povezavo med vnetjem in rakom so opazili že pred približno 150 leti. Virchow je bil prvi, ki je opazil levkocite v rakastem tkivu in predvideval, da rak izvira iz mest *kroničnega vnetja*. To zamisel so opustili, ko so predlagali, da je vnetje, prej kot vzrok, posledica delovanja imunskega sistema zoper rakaste celice in da lahko akutno vnetje pripomore k regresiji rakaste tvorbe. Z raziskavami v zadnjem desetletju se je zanimanje za Virchowo hipotezo obudilo; kronično vnetje naj bi res spodbujalo razvoj, rast in napredovanje tumorjev [27-29]. Kronične vnetne bolezni zato povezujemo s povečanim tveganjem za razvoj raka; kronična vnetna črevesna bolezen lahko npr. vodi v kolorektalen rak. Kronične infekcije naj bi bile razlog za več kot 15% malignih obolenj; kronična okužba s *Helicobacter pylori* je npr. najpogostejši vzrok za rak želodca, znana pa je tudi povezava med hepatitisom C in rakom jeter [28]. Kronično vnetje lahko vzročno povežemo z nastankom tumorjev iz več razlogov. Najprej zato, ker ostaja zaradi neprestane aktivacije makrofagov tkivo v vnetišču poškodovano in se, dokler se poškodba ne popravi, spodbuja celična proliferacija. Nadalje zato, ker lahko stalno prisotne reaktivne kisikove in dušikove spojine, ki jih sproščajo vnetne celice, povzročijo poškodbe v molekuli DNA (lahko se spremeni izražanje protoonkogenov, tumorje zavirajočih genov). Vnetne celice in številne molekule (citokini kot so TNF- α , IL-1, IL-6, kemokini kot je npr. IL-8 in encimi kot so matriksne metaloproteinaze, ciklooksigenaza 2) tako ustvarjajo mikrookolje, ki dopušča maligno transformacijo celic in je ugodno za razvoj tumorja. Posredujejo zmanjšano učinkovitost prepoznavanja in odstranjevanja rakasto spremenjenih celic (imunski odziv jih lahko zaobide), spodbujajo angiogenezo in imajo neposredne učinke na rast, invazijo in metastaziranje rakastih celic [29].

1.3.4 Vnetje in ateroskleroza

Vnetje je eden izmed številnih nevarnostnih dejavnikov za razvoj ateroskleroze, ki je skupna večini kardiovaskularnih bolezni. Raziskave v zadnjih letih nakazujejo, da aterogenezo spremlja šibko, a kronično vnetje v žilni steni in da ima vnetje ključno vlogo v vseh stopnjah razvoja ateroskleroze – od nastanka (disfunkcija, poškodba endotelija) do zapletov (predrtje ateroma, tromboze). Večina dejavnikov (velike strižne sile in tlak, imunske poškodbe, infekcije, reaktivne kisikove spojine, presnovne poškodbe), ki so odgovorni za poškodbo oz. disfunkcijo endotelija, poruši homeostazo s sprožitvijo vnetnega procesa [30-32]. Poveča se adhezivnost endotelija, ki omogoča, da v intimo prodirajo vnetne celice. Te skupaj z endotelijskimi celicami sproščajo citokine, rastne dejavnike in druge mediatorje, ki uravnavajo migracijo in razmnoževanje celic ter tvorbo ekstracelularnega matriksa. Če se škodljiv dejavnik ne odpravi, se vnetje v žilni steni vzdržuje in z leti počasi napreduje. Tako se lahko razvijejo velike lehe, ki postopoma zapirajo svetlino žile in ovirajo pretok krvi. Končno pa predrtje ateroma (povzročijo ga lahko npr. proteaze, ki jih izločajo aktivirani makrofagi) izzove trombozo, ki lahko vodi v popolno zaporo žil. Ateroskleroza zato obravnavamo kot vnetno bolezen, pri kateri se posamezne aterosklerotične lehe nahajajo na različni stopnji kroničnega vnetnega procesa [30, 31]. Na ateroskleroza poleg lokalnega vnetja v žilni steni vpliva tudi sistemski vnetni odziv. To potrjujejo vnetni kazalci; proteina akutne faze CRP in SAA, sta se namreč izkazala tudi kot dobra napovedna kazalca kardiovaskularnih dogodkov. Prav tako je že znano, da je ateroskleroza pospešena pri kroničnih vnetnih stanjih kot so npr. avtoimunske bolezni (RA, SLE) in kronične infekcije (npr. ponavljajoča okužba s *Helicobacter pylori*) [9,33]. Povrh vsega pa nekatera zdravila (npr. statini), ki znižujejo tveganje za kardiovaskularne dogodke, tudi omejijo vnetje – farmakološki učinek bi zatorej lahko bil posledica, ne samo znižanja serumskih lipidov ampak tudi protivnetnega delovanja [33].

1.4 METODE V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI VNETJA

Laboratorijske preiskave, ki nam omogočajo prepoznavanje vnetja so :

- bela in diferencialna krvna slika,
- hitrost sedimentacije eritrocitov (ESR),
- elektroforezna ločba serumskih proteinov (ocena $\alpha 1$ in $\alpha 2$ globulinske frakcije),
- kvantitativno določanje specifičnih proteinov (CRP, SAA, vnetni citokini).

Diagnostična občutljivost in specifičnost teh preiskav je različna, večinoma pa na osnovi rezultatov omenjenih preiskav lažje prepoznamo akutna kot kronična vnetna stanja [34]. V laboratorijski diagnostiki se zelo pogosto uporabljajo metode, ki temeljijo na interakciji protiteles z antigeni, ki so izzvali oz. spodbudili njihov nastanek – t.j. imunokemijske metode. Ena najpogostejših metod za določanje antigenov in protiteles v telesnih tekočinah je encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu ali ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Izvajamo jo v mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami (trdni nosilec), pri čemer je na stene vdolbinice nanese bodisi primarno protitelo (t.i. sendvič izvedba za določanje antigenov) bodisi antigen (indirektna izvedba za določanje protiteles). Sekundarna protitelesa se pri sendvič izvedbi metode povežejo z drugim epitopom kot primarna protitelesa, torej mora biti antigen, ki ga dokazujemo večvalenten. Pri indirektni izvedbi za določanje protiteles sekundarna protitelesa prepoznajo Fc del določenih protiteles; ker je Fc del vrstno specifičen, v tem primeru ni potrebno izdelati konjugata za vsako protitelo posebej. V obeh primerih so sekundarna protitelesa označena z encimom – najpogosteje se uporabljata alkalna fosfataza in hrenova peroksidaza. Obstaja tudi možnost, da je sekundarno protitelo konjugat z biotinom, ki ga prepozna z encimom označeni streptavidin, ali pa je z encimom označeno šele tretje protitelo, ki je specifično za izotip sekundarnega protitelesa. Ker je produkt encimske reakcije topen in obarvan, ga lahko določamo spektrofotometrično. Ob uporabi umeritvene krivulje je možna kvantitativna določitev antigena oz. protitelesa, saj je količina nastalega obarvanega produkta sorazmerna s količino analita v vzorcu. Specifičnost je lahko vprašljiva pri pospešenih izvedbah testa, saj se nam npr. pri višjih temperaturah ali višjih koncentracijah poveča nespecifična vezava. Odvisna je tudi od afinitete oz. avidnosti uporabljenih ali iskanih protiteles; protitelesa z nizko avidnostjo težko določamo [19, 20].

2. NAMEN DELA

Serumski amiloid A (SAA) je poleg C-reaktivnega proteina (CRP) najpomembnejši pozitivni reaktant akutne faze pri človeku. Medtem ko je CRP že standardiziran in se uporablja v rutinskih preiskavah kot vnetni kazalec, se mora SAA kot tak šele uveljaviti. Ker so vrednosti SAA povišane pri številnih akutnih in kroničnih vnetnih stanjih, bi lahko bil uporaben pokazatelj vnetja predvsem pri tistih vnetnih boleznih, kjer povišanje CRP ni nujno prisotno. Nedolgo nazaj so poročali tudi o prisotnosti protiteles proti SAA pri večini zdravih krvodajalcev in zato predpostavljali, da spadajo med naravna avtoprotitelesa. Dosedanje presečne študije še niso pokazale znatne korelacije med vrednostmi SAA in anti-SAA protiteles, prav tako ni poznana morebitna fiziološka vloga anti-SAA protiteles.

Naše **hipoteze** so sledeče:

1. Vnetne bolezni spremlja odklon v nivoju anti-SAA protiteles v primerjavi z vrednostmi pri zdravih krvodajalcih.
2. SAA lahko služi kot kazalec za spremljanje poteka in ocenjevanje aktivnosti bolezni pri bolnikih z *zgodnjim* revmatoidnim artritidom.
3. Pri bolnikih z *zgodnjim* revmatoidnim artritidom je SAA boljši pokazatelj vnetja ter odzivnosti na terapijo kot CRP.

Zato bomo sledili naslednjim **ciljem**:

1. V *presečni študiji*: določanje in primerjava vrednosti SAA in anti-SAA protiteles v serumih bolnikov z različnimi vnetnimi boleznimi.
2. V *longitudinalni študiji*: določanje SAA in anti-SAA protiteles v serumih bolnikov z *zgodnjim* revmatoidnim artritidom ter primerjanje njihovih nivojev z drugimi rutinsko določenimi parametri (ESR, CRP).
3. Določitev korelacije med SAA in aktivnostjo bolezni pri bolnikih z *zgodnjim* revmatoidnim artritidom.
4. Vrednotenje zamisli o možni fiziološki funkciji anti-SAA protiteles.

Vrednosti SAA in anti-SAA protiteles bomo določili z encimsko imunsko metodo na trdnem nosilcu. Pridobljene podatke bomo ustrezno statistično obdelali.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti

- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) analitske čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) analitske čistote, Merck, Darmstadt, Nemčija
- natrijev klorid (NaCl) analitske čistote, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
- kalijev klorid (KCl) analitske čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Tween®20 (polioksietilen sorbitan monolavrat), SigmaUltra, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- p-nitrofenilfenilfosfat, $\text{C}_6\text{H}_4\text{NNa}_2\text{O}_6\text{P}$, 5 mg tablete, Sigma, St.Louis, ZDA
- dietanolamin, $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$, MP, Biomedicals, Francija
- magnezijev diklorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) analitske čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- natrijev azid (NaN_3), ekstra čist, Merck, Darmstadt, Nemčija
- raztopina za zaščito celic ob zmrzovanju (Chryoprotective Medium), Lonza, Walkersville, MD, ZDA
- akrilamid/bis-akrilamid, 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, Kalifornija, ZDA
- Commassie Brilliant Blue®, barvilo, Sigma®, St.Louis, ZDA
- natrijev hidroksid (NaOH) analitske čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- klorovodikova kislina (HCl), 37%, Merck, Darmstadt, Nemčija
- TRIS® (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol), $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, analitsko čist, Merck, Darmstadt, Nemčija
- glicerol, $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$, Lex d.o.o., Portorož, Slovenija
- 2-merkaptetanol, $\text{OHCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, elektroforezna čistost, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Bromfenol modro, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
- glicin ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$) analitske čistote, Merck, Darmstadt, Nemčija
- metanol (CH_3OH) analitske čistote, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
- etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), 96%, Lex, Portorož, Slovenija
- razvijalec Kodak GBX, koncentrirana raztopina, Carestream Health, Rochester, NY, ZDA
- fiksir Kodak GBX, koncentrirana raztopina, Carestream Health, Rochester, NY, ZDA
- SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (raztopina peroksida in luminola), Rockford, IL, ZDA

3.1.2 Analizni kompleti

- analizni komplet za določanje človeškega SAA z encimsko imunsko metodo (Human Serum Amyloid A ELISA), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
 - standard rekombinantnega človeškega SAA1
 - pufer za redčenje standarda in vzorcev
 - mikrotitrna ploščica prekrita z rekombinantnimi monoklonskimi protitelesi proti človeškemu SAA

- rekombinantno monoklonsko protitelo proti človeškemu SAA, konjugirano z biotinom
 - kompleks streptavidin-peroksidaza (HRP), 100x koncentrirana raztopina
 - pufer za redčenje kompleksa streptavidin-HRP
 - spiralni pufer, 25x koncentrirana raztopina
 - stabiliziran kromogen- tetrametilbenzidin (TMB)
 - raztopina za zaustavitev reakcije (H_2SO_4)
- komplet za izolacijo RNA (RNeasy® Plus Micro kit), Qiagen, Hilden, Nemčija
 - RLT Plus pufer (lizirajoči pufer z gvanidinijevo soljo)
 - pufer RW1 (1. spiralni pufer)
 - pufer RPE (2. spiralni pufer)
 - voda brez RNaz
 - kolone za gDNA (gDNA Eliminator Mini Spin Columns)
 - kolone za RNA (RNeasy MinElute® Spin Columns)
 - zbiralne epruvetke (Collection Tubes): 1.5 ml, 2 ml
- komplet za reverzno transkripcijo (Reverse Transcription System), Promega, Madison, WI, ZDA
 - reverzna transkriptaza AMV
 - rekombinantni ribonukleazni inhibitor
 - oligonukleotidni začetniki (oligo(dT))
 - naključni heksamerni začetniki
 - kanamicin-pozitivna kontrola
 - mešanica deoksiribonukleotidtrifosfatov (dNTP)
 - pufer za reverzno transkripcijo, 10x koncentrirana raztopina, 100mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 1% Triton X-100
 - magnezijev klorid ($MgCl_2$)
 - voda brez nukleaz
- Komplet za verižno reakcijo s polimerazo Power SYBR Green (Power SYBR Green PCR Master Mix), Applied Biosystems, Warrington, VB
- analizni komplet za določanje človeškega IL-6 z encimskoimunsko metodo (Immunoassay kit human IL-6), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA

- standard rekombinantnega humanega IL-6
 - pufer za redčenje standarda
 - mikrotitrna plošča, prekrita z rekombinantnimi monoklonskimi protitelesi proti človeškemu IL-6
 - rekombinantno monoklonsko protitelo proti človeškemu IL-6, konjugirano z biotinom
 - kompleks streptavidin – peroksidaza (HRP), 100x koncentrirana raztopina
 - pufer za redčenje kompleksa streptavidin - peroksidaza (HRP)
 - koncentrirani pufer za spiranje, 25x koncentrat
 - stabilizirani kromogen tetrametilbenzidin (TMB)
 - raztopina za zaustavitev reakcije (H₂SO₄)
- Liofilizirani oligonukleotidni začetniki, (Small Sequence, Detection Primers), Applied Biosystems, Warrington, VB (Preglednica II)

Preglednica II: Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov, uporabljenih v verižni reakciji s polimerazo v realnem času (qPCR). F in R-smiselni in protismiselni začetni oligonukleotid, MIP-makrofagni vnetni protein, IL-interlevkin

GEN ZA:	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE ZAČETNIKA	T[°C] PRILEGANJA
beta aktin (endogena kontrola)	F:5'-AGCCTCGCCTTTGCCGATCCG-3' R:5'-GGCCTCGTCGCCACATAGGA-3'	60,3
E-selektin	F:5'-GCCGTCCGCCAGCCTCAGAA-3' R:5'-AGCCTCGCTCGGGGTTGGAC-3'	61,0
MIP-3-alfa	F:5'-GGGCTTCACACGGCAGCTGG-3' R:5'-TGAAACCTCCAACCCAGCAAGGT-3'	60,8
IL-6	F:5'-GAGGCTCATTCTGCCCTCGAGCC-3' R:5'-CTGTCTGTGTGGGGCGGCTACA-3'	61,0
IL-8	F:5'-ACAAGAGCCAGGAAGAAACCACCGG-3' R:5'-GTGTTGGCGCAGTGTGGTCCAC-3'	60,9

3.1.3 Pufri in raztopine

Za anti-SAA ELISA:

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

Na₂HPO₄x2H₂O2,3 g
 KH₂PO₄0,4 g
 NaCl16,0 g
 KCl0,4 g
 dH₂Odo 2000 ml
 (za uravnavanje pH uporabimo 2M NaOH ali 2M HCl)

- PBS + Tween®20 pufer (s fosfatom pufrana fiziološka raztopina + 0.1% Tween®20 - pH=7,4)

Tween®201,0 g
 PBS pufer1000 ml

- 1 ut/vol % BSA v PBS + Tween®20 pufri

goveji serumski albumin1,0 g
 PBS+Tween®20 pufer100 ml

- 1 ut/vol % BSA v PBS pufri

goveji serumski albumin1,0 g
 PBS pufer100 ml

- Dietanolaminski (DEA) pufer (pH=9,8)

MgCl₂ x6H₂O0,1 g
 NaN₃0,20 g
 dietanolamin102 g
 dH₂O500 ml
 2M HCldo pH= 9,8 (~70 ml)
 dH₂Odo 1000 ml

Za SDS PAGE:

- Mešanica za 1 mini-gel:

	Ločitveni gel (10%)	Koncentracijski gel (4%)
akrilamid/bisakrilamid	1,17 ml	0,32 ml
10 ut/vol% SDS	35 µl	24 µl
1,5 M TRIS-Cl pH=8,8	0,88 ml	/
0,5 M TRIS-Cl pH=6,8	/	0,6 ml
dH ₂ O	1,44 ml	1,4 ml

Tik pred uporabo dodamo:

10 ut/vol% APS	21 µl	8 µl
TEMED	42 µl	16 µl

- Pufri za pripravo gelov:

	1,5 M TRIS-Cl (pH=8,8)	0,5 M TRIS-Cl (pH=6,8)
TRIS	18,2 g	6,1 g
dH ₂ O	100 ml	100 ml

(za uravnavanje pH uporabimo 2M HCl)

- Pufer za vzorce: reducirajoči SDS pufer, 4x koncentrirana raztopina; proteinski vzorec pripravimo tako, da je končna koncentracija vzorčnega pufera 1x.

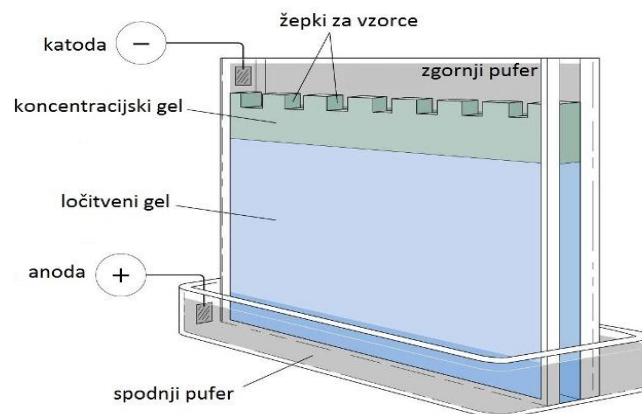
0.5 M TRIS-Cl (pH=6,8)5 ml	(125 mM)
SDS1,6 g	(8 ut/vol%)
glicerol8 ml	(40 vol/vol%)
2-merkaptoetanol4 ml	(20 vol/vol%)
bromfenol modro0,004 g	(0,02 ut/vol%)
dH ₂ Odo 20 ml	

- Spodnji pufer za elektroforezo:

TRIS3 g
glicin14,5 g
dH ₂ Odo 1000 ml

- Zgornji pufer za elektroforezo: spodnjemu pufru dodamo SDS do koncentracije 0,1%.

10% SDS3 ml
spodnji pufer za elektroforezo300ml



Slika 1: Shema gela za poliakrilamidno gelsko elektroforezo. Pri elektroforezi z dvema geloma in pufrskima sistemoma je ločba proteinov boljša. (Prirejeno po [35])

- 10 ut/vol% SDS

SDS10 g
dH ₂ Odo 100 ml

- 10 ut/vol% amonijev persulfat (APS)

APS10 g
dH ₂ Odo 100 ml

Za prenos proteinov na nitrocelulozno membrano (Western blotting):

- Blot pufer za prenos proteinov na nitrocelulozno membrano:

glicin9 g
--------	----------

TRIS2,5 g
metanol167 ml
dH₂O do 1000 ml
(pred uporabo dodamo 1,5 ml 10% SDS na 1 liter blot puфра)

Za imunsko detekcijo na pivniku:

- TBS puфра (s TRIS-om puфраna fiziološka raztopina; pH=7,4)

TRIS-HCl0,605 g
NaCl4,385 g
dH₂Odo 500 ml

- TBS+Tween®20 puфра (s TRIS-om puфраna fiziološka raztopina+0.05%Tween®20)

Tween®200,125 g
TBS puфра250 ml

- Blokirajoči puфра

posneto mleko v prahu5,0 g
TBS +Tween®20 puфра250 ml

3.1.4 Biološki material

- serumi bolnikov z različnimi boleznimi, katerih skupna značilnost je vnetno dogajanje pri nastanku in/ali razvoju bolezni; testirali smo **236** serumov, ki so pripadali **128** bolnikom. Skupine bolnikov so vključevale bolnike z zgodnjim neopredeljenim artritismom (n = 29), bolnike z infekcijsko boleznijo, pri čemer smo ločili med bolniki z virusno (n = 20) in bakterijsko (n = 30) infekcijo, bolnike s srčno-žilnimi boleznimi (n = 26) in onkološke bolnike (n = 18). Od 29 bolnikov z artritismom je bilo 16 takšnih, ki jim je bila postavljena diagnoza *zgodnji* revmatoidni artritis; za to skupino bolnikov smo imeli kontrolno skupino, in sicer bolnike z osteoartrito (n = 5). Serumi bolnikov so bili pridobljeni iz obstoječih zbirk serumov Laboratorija za imunologijo revmatizma, Kliničnega oddelka za revmatologijo, UKC Ljubljana. Iz zbirke serumov, ki nastaja s spremljanjem bolnikov z zgodnjimi oblikami artritisa v prospektivni študiji (16. cilj raziskovalnega programa Sistemske avtoimunske bolezni-šifra ARRS P3-0314), smo testirali le serume tistih bolnikov, za katere smo imeli nabor vsaj 3 serumov (3 zaporedni odvzemi). Testirani serumi so bili shranjeni različno dolgo; serumi

bolnikov z artritisom so bili stari največ 2 leti, serumi bolnikov iz drugih skupin pa 3-5 let. Vse osebe so bile seznanjene in so soglašale z namenom uporabe njihovih serumov.

- rekombinantni človeški apo-serumski amiloid A, Lot#111066, 1g/l, PeproTech, New Jersey, ZDA
- goveji serumski albumin brez esencialnih maščobnih kislin, BSA Cohn Fraction V, Sigma-Aldrich Co., St.Louis, ZDA
- rekombinantni kozji imunoglobulin G (IgG) označen z alkalno fosfatazo (AP), Axell®, Accurate Chemical & Scientific Corporation, NY, ZDA
- človeške endotelijske celice koronarne arterije (human coronary artery endothelial cells, HCAEC), Lonza, Walkersville, MD, ZDA; po podatkih dobavitelja so bile to celice 3. pasaže, pridobljene iz 21-letnega moškega bele rase, brez žilnih bolezni
- gojišče za HCAEC, Lonza, Walkersville, MD, ZDA (preglednica III)

Preglednica III: Sestava gojišč za človeške endotelijske celice koronarne arterije (HCAEC).

GOJIŠČE		SESTAVINA GOJIŠČA	KOLIČINA
POPOLNO S 5% FBS	POPOLNO Z 0% FBS	osnovno gojišče za HCAEC EBM-2 (Endothelial Cell Basal Medium-2)	500 ml
		rekombinantni humani epidermalni rastni dejavnik (hEGF)	0,5 ml
		hidrokortizon	0,2 ml
		gentamicinijev sulfat in amfotericin B (GA-1000)	0,5 ml
		rekombinantni humani fibroblastni rastni dejavnik (hFGF-B)	2 ml
		rekombinantni humani žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF)	0,5 ml
		dolgi R3 rekombinantni insulinu podobni rastni dejavnik 1 (R3-IGF-1)	0,5 ml
		askorbinska kislina	0,5 ml
	X	serum govejega ploda (Fetal Bovine Sera, FBS)	25 ml

- mišje monoklonsko protitelo proti človeškemu rekombinantnemu SAA, SAA(115): sc-59679, 100 mg/l, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornija, ZDA
- izolirane IgG frakcije zdravih krvodajalcev iz obstoječih bank Laboratorija za imunologijo revmatizma
- označevalec molekulske mase SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA

- označevalec molekulske mase Cruz MarkerTM Molecular Weight Standard: sc-2035, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornija, ZDA
- s hrenovo peroksidazo konjugirana kozja protitelesa proti kunčjim IgG (goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2030), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornija, ZDA
- poliklonska kunčja protitelesa proti človeškemu SAA (sekvenca 1-8), posredovana od prof. Ernsta Malleta, Medical University of Graz
- posneto mleko v prahu, živilski izdelek

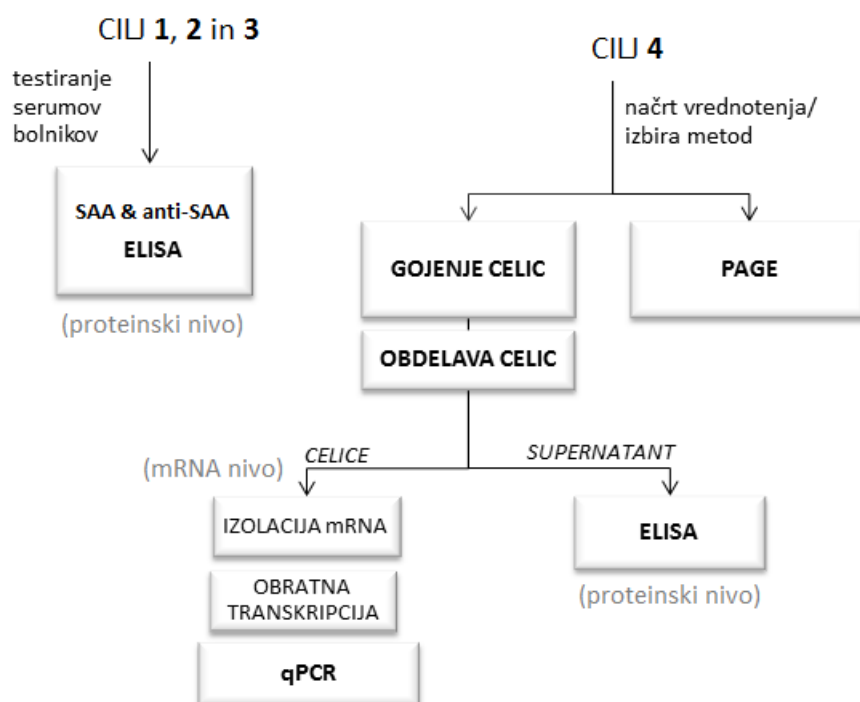
3.1.5 Aparature in ostali materiali

- precizna tehtnica Mettler Toledo, type PM2500, Mettler Toledo AG, Griefensee, Švica
- pH meter Mettler Toledo SevenEasy, Columbus, Ohio, ZDA
- spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih plošč RainBow Thermo, Tecan Sunrise, Männedorf, Švica
- vibracijski mešalnik, vrtinčnik, Vortex, Assister, Sondheim, Nemčija
- magnetno mešalo, RTC basic IKAMAG safety control, IKA, Staufen, Nemčija
- stresalnik Promax 1020, Heidolph Instruments, Schwabach, Nemčija
- polistirenske mikrotitrskе ploščice Costar High Binding 3590, 96 well EIA/RIA Plates, Corning, New York, ZDA
- multipipete (100 μ L, 300 μ L), Research, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- (sterilni) pipetni nastavki (10 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 1000 μ L), Eppendorf, Hamburg
- centrifuga Mini spin plus, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- centrifuga Universal 32R: tip 1610, Hettich zentrifugen, Tuttingen, Nemčija
- elektroforezna kadička za SDS-PAGE: Mini Protean, Bio-Rad, Richmond, ZDA
- elektroforezna kadička za WB: Mini Trans-Blot, Bio-Rad, Richmond, ZDA

- generator napetosti toka Bio-Rad, Model 1000/500 Power Supply, Bio-Rad, Richmond, ZDA
- injekcijska brizga Hamilton Syringe Model 1701N in 1705N, 10 μ l in 50 μ l, Sigma, St. Louis, ZDA
- nitrocelulozna membrana, Schleicher& Schuell, Dassel, Nemčija
- aseptična komora z laminarnim pretokom zraka, LaminAir, Holten, Allerød, Danska
- celični inkubator, Heto-Holten Cellhouse 154, Astel, Francija
- inverzni mikroskop, Eclipse TS100, Nikon, Japonska
- vodna kopel, Water Bath TW8, Julabo, Seelbach, Nemčija
- vakuumska črpalka, Vacuum Pump XF54 230 50, Millipore, Francija
- plošče s 6 vdolbinicami, Tissue culture test plates: 9.6 cm², TPP, Trasadingen, Švica
- plastenke za gojenje celic 75 cm², T-75 Tissue culture flask, TPP, Trasadingen, Švica
- UV/VIS enožarkovni spektrofotometer M501, Camspec, Leeds, Velika Britanija
- aparat za verižno reakcijo s polimerazo (PCR), Thermal Cycler 2720, Applied biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA
- aparatura za PCR v realnem času, Step One Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Cambridge, Velika Britanija
- Kodak Biomax XAR film
- drobni laboratorijski material (magnetna mešala, centrifugirne epruvete, filtrirni papir...)

3.2 METODE

Za doseg zastavljenih ciljev smo se pri eksperimentalnem delu poslužili različnih metod. Shema poteka dela in uporabljene metode so predstavljene na sliki 2. Prisotnost SAA in anti-SAA protiteles v serumih bolnikov smo določali s pomočjo encimsko imunskega testa. V okviru četrtega cilja smo preverjali zamisli o morebitni fiziološki funkciji anti-SAA protiteles. Da bi preverili ali anti-SAA protitelesa izničijo/zmanjšajo učinke SAA na celice, smo gojili človeške endotelijske celice koronarne arterije (HCAEC) in jih izpostavili načrtovanim tretmajem. Po izvedbi poskusov smo določali izločanje vnetnih in adhezijskih molekul iz celic (testiranje supernatanta na proteinskem nivoju) oziroma izražanje genov za tovrstne molekule v celicah (mRNA nivo). Da bi ovrednotili zamisel o morebitni encimski (hidrolitični) funkciji anti-SAA protiteles, smo SAA inkubirali z IgG frakcijo z visokim odzivom na anti-SAA protitelesa in vzorce nato analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo.



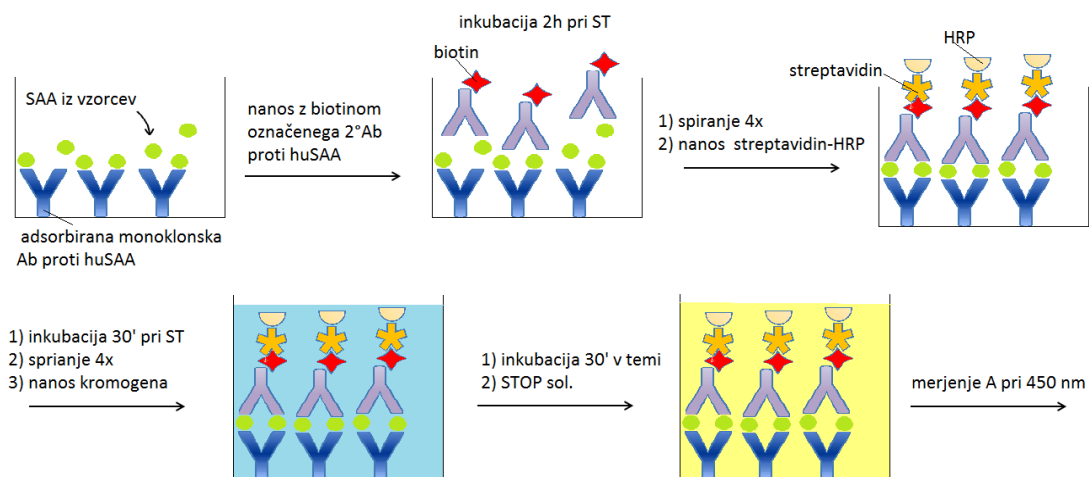
Slika 2: Potek dela in pri tem uporabljene metode.

3.2.1 Encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu

Določanje serumskega amiloida A (sendvič ELISA)

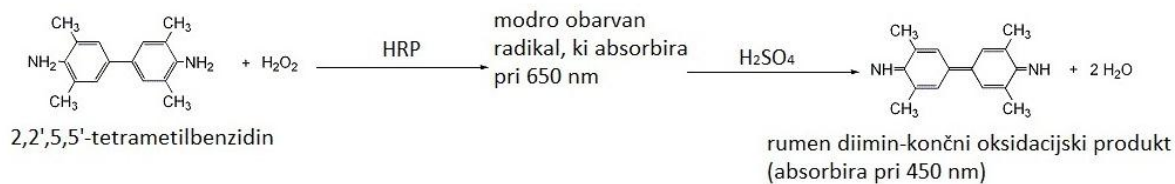
Serumski amiloid A smo določali s pomočjo analiznega kompleta za določanje človeškega SAA z encimsko imunsko metodo (Invitrogen Human Serum Amyloid A ELISA). Pri tem

smo se držali postopka predpisanega s strani proizvajalca [1]. Opisana metoda je sendvič izvedba encimsko imunskega testa na trdnem nosilcu (slika 3), ki omogoča kvantitativno določitev človeškega SAA bodisi v serumu, plazmi ali mediju tkivne kulture.



Slika 3: Postopek določanja serumskega amiloida A z encimsko imunsko metodo na trdnem nosilcu.

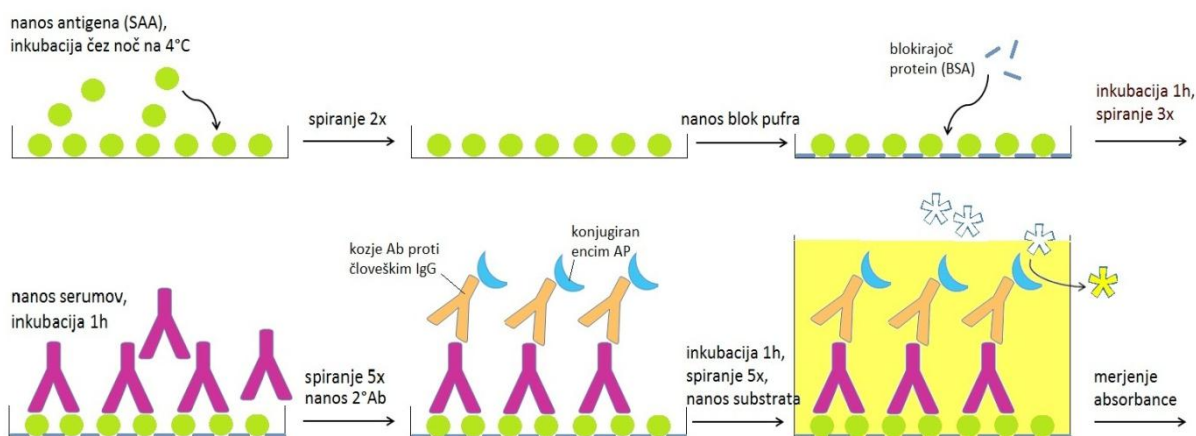
Primarna protitelesa so v tem primeru adsorbirana na dnu vdolbinic mikrotitrne plošče, sekundarna protitelesa, ki jih dodamo po nanosu vzorcev in standardov, pa so usmerjana proti drugemu epitopu človeškega SAA in so označena z biotinom. Med biotinom in streptavidinom iz kompleksa streptavidin-hrenova peroksidaza (HRP) se tvori močna nekovalentna vez. Kompleks streptavidin-HRP je zadnji člen v tako sestavljenem štiričlenskem »sendviču« in je ključnega pomena za končno spektrofotometrično detekcijo. Encim HRP namreč katalizira oksidacijo kromogena (tetrametilbenzidin) v modro obarvan produkt, ki po dodatku raztopine žveplove (VI) kisline (t.i. stop solution) postane rumen (nastanek diimina) (slika 4). Ker z vmesnimi spiranji preprečimo nespecifično vezavo protiteles in kompleksa streptavidin-HRP, je nazadnje intenziteta obarvanja v vsaki vdolbinici mikrotitrne plošče sorazmerna s koncentracijo človeškega SAA, prisotnega v posameznem vzorcu. Proizvajalec navaja, da je komplet uporaben le v raziskovalne namene in ni namenjen uporabi v diagnostiki.



Slika 4: Reakcija, ki omogoča kolorimetrično detekcijo - s hrenovo peroksidazo katalizirana oksidacija tetrametilbenzidina. (Prirejeno po [36]).

Določanje protiteles proti serumskemu amiloidu A

Protitelesa proti človeškemu serumskemu amiloidu A smo določali po nekoliko prirejenem postopku kot ga opisujeta Rosenau in Schur [26] (slika 5). V vdolbinico obsevane polistirenske mikrotitrne plošče (Costar High Binding 3590, 96 well plates) smo nanegli po 50 µl raztopine človeškega rekombinantnega serumskega amiloida A (Lot#111066, 1g/l, PeproTech, New Jersey, ZDA) v PBS pufru s pH=7,4. Končna koncentracija SAA v vdolbinici je bila 4mg/l, torej smo za celotno ploščo potrebovali 20µl SAA in 4980µl PBS pufra. Ploščo smo pokrili s samolepilno folijo in jo inkubirali preko noči v hladni sobi pri 4°C. Naslednji dan smo raztopino iz vdolbinic odlili in ploščo otresli na staničevini ter vdolbinice sprali 2-krat s po 250 µl 0,1% Tween®20 v PBS (pH=7,4) pufru (odslej *spiralni pufer*). Nato smo v vdolbinice nanegli po 200 µl blok pufra, t.j. 1% raztopine BSA v PBS pufru, in ploščo inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi (22-26°C).



Slika 5: Postopek določanja protiteles proti serumskemu amiloidu A z encimsko imunsko metodo na trdnem nosilcu.

Po eni uri smo vsebino plošče ponovno odlili, ploščo otresli na staničevini in sprali vdolbinice 3-krat s po 250 µl spiralnega pufra. V naslednjem koraku smo v vdolbinice nanegli vzorce (razredčeni serumi bolnikov) in standarde (razredčen serum izbranega krvodajalca). Vzorce smo pripravili tako, da smo serume bolnikov premešali na vibracijskem mešalu in jih nato redčili v razmerju 1: 100 v 1%BSA-PBS-0,1%Tween®20 pufru. Vzorce smo nanašali v dvojnikih in po 50 µl na vdolbinico, kar pomeni, da smo potrebovali vsaj 100 µl vsakega vzorca. Odločili smo se, da pripravimo vedno po 300 µl vzorca (3 µl seruma in 297 µl pufra), saj se napaka pri pipetiranju (s pipeto 0,5-10µl) z manjšanjem volumnov večja. Kot izhodni standard smo vzeli serum zdravega krvodajalca, za katerega je bilo v predhodnih analizah ugotovljeno, da daje visok odziv na anti-SAA protitelesa. Redčili smo ga v 1%BSA-PBS-0,1%Tween®20 pufru v razmerju 1: 100. Drugi

standard smo dobili tako, da smo dvakratno razredčili prvi standard, tretjega tako, da smo dvakratno razredčili drugega in tako naprej do zadnjega standarda, ki je vseboval serum izbranega krvodajalca razredčen v uporabljenem pufru v razmerju 1:6400. Tako dobljeno redčitveno linijo izhodnega standarda smo uporabili pri vseh analizah. Prav tako smo na ploščico vsakič nanesli po 2 visoki in 2 nizki kontroli- tudi to so bili serumi zdravih krvodajalcev, katerih odziv na anti-SAA protitelesa smo poznali iz predhodnih analiz. Po nanosu vzorcev in standardov smo ploščo inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. Potem smo vsebino plošče odlili, vdolbinice sprali 5-krat s po 250 μ l spiralnega pufra in v vsako nanesli po 50 μ l predhodno razredčenih sekundarnih protiteles, t.j. afinitetno prečiščenih kozjih protiteles, usmerjenih proti človeškim imunoglobulinom G (IgG) in konjugiranih z encimom alkalno fosfatazo (AP). Sekundarna protitelesa smo razredčili v razmerju 1:1000 v 1% BSA-PBS-0,1% Tween®20; za celotno ploščo smo tako potrebovali 5 μ l konjugata in 5 ml pufra. Po enourni inkubaciji pri sobni temperaturi smo vsebino plošče ponovno odlili, vdolbinice sprali 5-krat s po 250 μ l spiralnega pufra in v vdolbinice nanesli po 50 μ l raztopine kromogenega substrata. Raztopino substrata smo pripravili 5 minut pred začetkom zadnje serije spiranja plošče, in sicer iz 5 ml DEA pufra (pH=9,8) in 2 5-miligramskih tabletk p-nitrofenilfosfata. Končna koncentracija substrata v vdolbinici je bila torej 2 g/l. Po dodatku substrata se je raztopina v vdolbinicah obarvala rumeno. Encim alkana fosfataza, ki je vezan na sekundarna protitelesa, namreč katalizira hidrolitični odcep fosfatne skupine iz molekule substrata, pri čemer nastaja rumeno obarvan p-nitrofenol. Približno 5 minut po dodatku substrata smo ploščico vstavili v spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih plošč in merili absorbanco pri $\lambda=405$ nm tako dolgo, da je absorbanca najvišjega standarda dosegla vrednost približno 2,5.

V MS Excelu smo ustvarili lastno predlogo, kamor so se po merjenju izpisale meritve. Podatke smo nato računsko obdelali; izračunali smo povprečne absorbance vzorcev in koeficient variacije, nato pa od povprečnih absorbanc odšteli absorbanco slepega vzorca (samo 1% BSA-PBS-0,1% Tween®20 pufer). Vsakič smo izračunali tudi povprečni korekcijski faktor analize, ki je moral biti med 0,8 in 1,2, da smo zagotovili točnost rezultatov analize. Korekcijski faktor za posamezen standard smo izračunali kot razmerje med ocenjeno in izmerjeno absorbanco tega standarda, pri čemer nam je ocenjeno oziroma pričakovano absorbanco predstavljala povprečna absorbanca standarda, izračunana iz 7 analiz. Najvišjemu standardu smo nato pripisali 500 arbitrarnih enot. Vzorce, katerih absorbance so presegle vrednost 2,5 (skupno jih je bilo samo 10) smo ponovno testirali in

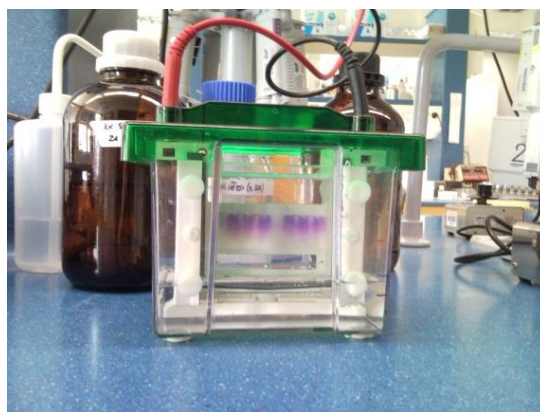
naslednjič serume redčili v 1%BSA-PBS-0.1%Tween®20 pufru v razmerjih 1:500 ali 1:1000.

Pred izvedbo prve anti-SAA ELISA smo na mikrotitrsko ploščo v vsaki tretji stolpec namesto antigena (SAA) nanесли PBS pufer (pH 7,4). Vsak vzorec smo nato na ploščo nanесли po 3-krat, pri čemer je bila zadnja vdolbinica t.i. *vzorčna slepa*. Če smo od odziva te vdolbinice odšteli absorbanco slepega vzorca, smo dobili prispevek SAA h končni absorbanci. Pri 92% v prvi analizi testiranih vzorcev je ta prispevek znašal manj kot 10% končne absorbance oziroma pri 67% celo manj kot 3%. Vzorčne slepe zato v naslednjih analizah nismo delali. Iz podatkov za 4 vzorce (2 nizki in 2 visoki kontroli), ki smo jih vsakič nanесли na ploščico, smo izračunali tudi natančnost znotraj analize in natančnost med analizami (ponovljivost). Povprečni koeficient variacije znotraj ene analize je bil 2,63% (izračunan kot povprečna vrednost koeficientov variacije med dvojniki), med analizami pa 14,2% (v rutinskih preiskavah je dovoljen do 20%).

3.2.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE)

Za izvedbo elektroforeze smo uporabili BioRad Mini Protean celico, ki smo jo sestavili po navodilih proizvajalca. Elektroforeza je potekala pod reducirajočimi pogoji. Natančna sestava zmesi za pripravo poliakrilamidnega gela je podana v podpoglavju *Materiali*. Najprej smo pripravili mešanico za 10 % ločitveni gel (amonijev persulfat in TEMED smo dodali tik pred uporabo) in jo vbrizgali med stekleni plošči do 3 cm od vrhnjega roba. Stekleni ploščici smo predhodno očistili z detergentom in jih razmastili z 98% etanolom. Ločili smo jih z vmesniki debeline 0,75 mm in jih vpeli v kaseto. Da se ločitveni gel ne bi izsušil, smo čezenj z brizgo previdno nanесли destilirano vodo. Ko je polimerizacija potekla (približno po 15 minutah), smo vodo nad gelom popivnali s filter papirjem. Nad ločitveni gel smo nato nanесли mešanico za 4% koncentracijski gel (tudi v tem primeru smo amonijev persulfat in TEMED dodali tik pred uporabo) in vstavili glavniček pod kotom tako, da smo izpodrinili zračne mehurčke. Med polimerizacijo gela smo pripravili vzorce za analizo (dodali smo jim reducirajoči SDS pufer in jih segrevali 5 minut pri 95°C). Gelsko kaseto smo nato iz stojala prestavili na nosilno ogrodje in sestavili celico, kamor smo nalili zgornji pufer. Iz gela smo odstranili glavniček in s pomočjo Hamiltonove brizge z zgornjim pufrom sprali v gelu nastale žepke. V skrajno levi žepok smo nanесли

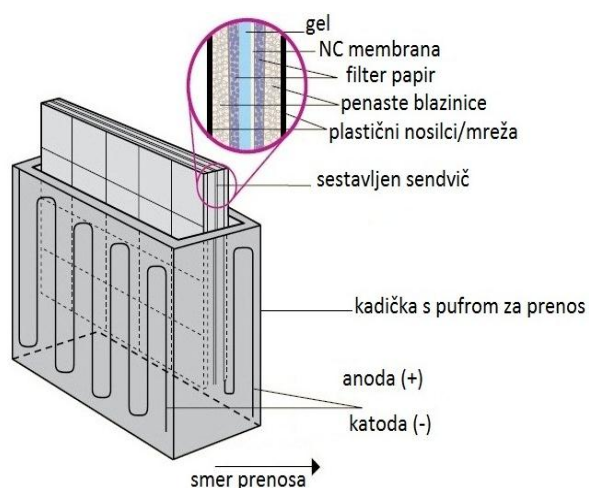
označevalec molekulske mase, v preostale pa pripravljene vzorce. Celico z zgornjim pufrom smo potem vstavili v kadičko, kamor smo nalili spodnji pufer. Tako sestavljeno elektroforezno celico (slika 5) smo priključili na generator napetosti toka. Elektroforeza je tekla pri napetosti 125V in toku 12,5 mA približno 1 uro-ustavili smo jo, ko je bila fronta barvila približno 1-2 cm pred koncem gela.



Slika 5: Celica za poliakrilamidno gelsko elektroforezo.

3.2.3 Prenos po Westernu in imunodetekcija

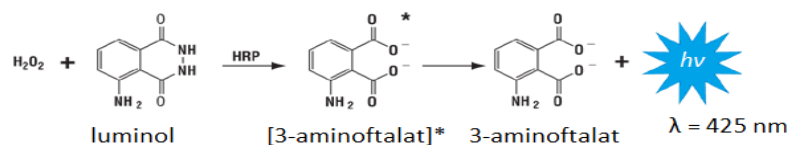
Po končani SDS-PAGE smo proteine s pomočjo električnega toka prenesli iz poliakrilamidnega gela na nitrocelulozno (NC) membrano (t.i. Western prenos) in opravili imunsko detekcijo. Pred prenosom smo si pripravili NC membrano in filter papir primerne velikosti (malo večje od gela) ter 1 liter blot pufru. V posodo smo nalili nekaj blot pufru in z njim omočili penasto blazinico, en filter papir in NC membrano. Gel smo nato prenesli na drugi kos suhega filter papirja, tega pa počasi položili na omočeno peno v plastičnem nosilcu. Tako se je filter papir počasi omočil in pod njim niso nastajali mehurčki zraka, ki bi motili prevajanje toka in s tem prenos proteinov. Na plastični nosilec oziroma mrežo smo torej po vrsti zložili: omočeno blazinico, suh filter papir z gelom, omočeno NC membrano, omočen filter papir in še eno omočeno blazinico. Tako pripravljen sendvič (slika 6) smo dobro speli med plastična nosilca in ga vstavili v ogrodje elektroforezne kadičke, v katero smo nalili pufer za prenos. Pazili smo, da je bil gel obrnjen proti negativnemu in NC membrana proti pozitivnemu polu. Prenos je potekal 32 minut pri stalni napetosti 100 V in toku 250 mA. Po končanem prenosu smo sendvič razdrli in na mokri NC membrani s svinčnikom nežno označili robove gela. Membrano smo vložili med dva suha filter papirja in jo 10 minut sušili na toplem zraku. V kolikor detekcije nismo izvedli isti



Slika 6: Celica za Western prenos. (Prirejeno po [37])

Prenos je potekal 32 minut pri stalni napetosti 100 V in toku 250 mA. Po končanem prenosu smo sendvič razdrli in na mokri NC membrani s svinčnikom nežno označili robove gela. Membrano smo vložili med dva suha filter papirja in jo 10 minut sušili na toplem zraku. V kolikor detekcije nismo izvedli isti

dan, smo membrano po sušenju shranili v skrinji na -20°C . Za imunsko detekcijo smo NC membrano razrezali na 0,4 cm trakce ali ohranili celo (odvisno od zasnove poskusa). Najprej smo jo inkubirali v blok pufri (5% mleko v prahu v TBS+0,05% Tween®20) 30 minut na stresalniku, zato da bi preprečili nespecifično vezavo protiteles na površino membrane. Sledilo je spiranje z destilirano vodo, potem pa inkubacija s primarnimi protitelesi (poliklonska kunčja protitelesa proti človeškemu SAA, sekvenca 1-8; posredoval nam jih je prof. Ernst Malle, Medical University of Graz) 2 uri in 10 minut na stresalniku pri sobni temperaturi. Če NC membrane nismo razrezali na trakce, smo jo inkubirali z vsemi osmimi anti-SAA protitelesi naenkrat, kadar smo membrano razrezali, pa smo vsakega od osmih trakcev inkubirali s svojim primarnim anti-SAA protitelesom. Primarna protitelesa smo redčili v blok pufri v razmerju 1:100. Membrano/trakce smo nato spirali: 2x po 5 minut z blok pufrom, 2x po 5 minut s TBS-0,05%Tween®20 in še 1x 5 minut z blok pufrom. S sekundarnimi protitelesi (s hrenovo peroksidazo konjugirana kozja protitelesa proti kunčjim imunoglobulinom G), razredčenimi v blok pufri v razmerju 1:200, smo membrano inkubirali 40 minut. Sledilo je spiranje: 5 minut z blok pufrom, 5 minut s TBS-0,05%Tween®20 in 5 minut s TBS (pH=8,0). Membrano/trakce smo nato pokapali z luminolom, jo/jih vstavili med prozorno folijo in odnesli v temnico. Luminol je substrat za encim, konjugiran na sekundarnih protitelesih- HRP namreč katalizira oksidacijo luminola v 3-aminoftalat. Oksidacija poteka preko vmesnega vzbujenega produkta, ki po prehodu v osnovno stanje odda foton določene valovne dolžine (kemiluminiscenčna reakcija) (slika 7). Čez membrano smo v temi oziroma pri rdeči svetlobi položili ustrezno velik kos filma, oboje vstavili v kaseto za razvijanje filma in počakali 0,5-2 minute. Film smo potem kopali v razvijalcu, fiksirju in na koncu v destilirani vodi.



Slika 7: Kemiluminiscenčna reakcija luminola, ki omogoča detekcijo na filmu.(Prirejeno po [38]).

3.2.4 Delo s celičnimi kulturami

Eksperimente smo izvajali na primarni celični kulturi človeških endotelijskih celic koronarne arterije (HCAEC). Po podatkih dobavitelja (Lonza, Walkersville, MD, ZDA) so bile pridobljene celice v 3. pasaži, izolirane iz koronark 21-letnega moškega bele rase.

Certifikat analize zagotavlja možnost 16-kratnega pomnoževanja celic. Mi smo celice pomnožili do 3-krat in za poskuse uporabljali 4. ali 5. celično pasažo.

Delo z endotelijskimi celicami je potekalo v laboratoriju za celične kulture, to je v aseptičnem prostoru, ki zagotavlja sterilno delo. V njem je poleg aseptične komore z laminarnim pretokom zraka tudi celični inkubator. V aseptični prostor smo vstopali samo z ustrežno zaščitno opremo, ki smo jo oblekli v predprostoru. Tako pri rokovanju s celicami kot tudi pri pripravi vseh reagentov oziroma celičnih medijev smo uporabljali sterilne materiale-sterilne pipetne nastavke s filtrom, sterilne plošče in plastenke za gojenje celic ter sterilne epruvete. Vse nesterilne predmete (stojala, pipete), ki smo jih postavili v aseptično komoro, smo najprej obrisali s 70% etanolom. Delovne površine smo ob koncu dela očistili z razkužilom in 70% etanolom, v aseptični komori pa prižgali tudi UV-lučko.

Priprava gojišča

Medij za gojišče EBM-2 (Endothelial Cell Basal Medium-2), ki smo ga hranili v hladilniku na 4°C, smo pred pripravo segreli na vodni kopeli na 37°C. Osnovnemu mediju smo v aseptični komori dodali ustrezno količino dodatkov (Single Quots) in tako dobili popolno gojišče za HCAEC z 0% FBS. Temu gojišču smo nato dodali še serum govejega ploda (FBS), da smo dobili t.i. popolno gojišče za HCAEC s 5% FBS. Natančna sestava gojišč je podana v podpoglavju *Materiali*. Popolno gojišče s 5% FBS smo odpipetirali v plošče za gojenje celic s 6 vdolbinicami- v vsako vdolbinico 2 ml. Plošče smo pred nasaditvijo celic segreli v inkubatorju na 37°C.

Odmrzovanje in nasaditev celic

Celice smo hranili v zamrzovalnih stekleničkah v tekočem dušiku v obliki goste suspenzije v zamrzovalnem mediju. Zamrzovalne stekleničke smo označili z naslednjimi podatki: vrsta in pasaža celične kulture, datum zamrznitve in število celic. Glede na površino nasaditve (število vdolbinic, ki smo jih potrebovali za izvedbo poskusa smo pomnožili s površino 1 vdolbinice, ki je 9,6 cm²) in glede na priporočeno naselitveno gostoto smo iz posode s tekočim dušikom vzeli stekleničko z zadostnim številom celic in jo 1-2 minuti segrevali na vodni kopeli na 37°C. Vsebino smo nato previdno premešali s pipeto in odpipetirali ustrezno prostornino celične suspenzije v vdolbinice plošče, kamor smo poprej nalili gojišče s 5% FBS. Prostornino celične suspenzije potrebne za 1 vdolbinico smo izračunali po enačbi 1.

$$\text{prostornina (ml)} = \frac{\text{nasaditvena gostota } \left(\frac{\text{\textit{število celic}}}{\text{cm}^2}\right) \times \text{površina (cm}^2\text{)}}{\text{koncentracija } \left(\frac{\text{\textit{število celic}}}{\text{ml}}\right)}$$

Enačba 1: Izračun prostornine celične suspenzije

Ploščo z nasajenimi celicami smo rahlo pretresli in postavili v celični inkubator (37°C, 5% CO₂, 100% relativna vlažnost). Po 4 urah smo v aseptični komori z vakuumsko črpalko gojišče odsesali (s tem smo odstranili tudi vse celice, ki se niso prilepile na dno vdolbinic) in ga zamenjali za enakega svežega (gojišče s 5% FBS, segreto na 37°C).

Gojenje celic

Pod inverznim mikroskopom smo spremljali rast in razmnoževanje celic, ki so se pritrdile na dno vdolbinic. Vsaki drugi dan smo jim menjali gojišče – v aseptični komori smo z vakuumsko črpalko odsesali staro gojišče in s sterilno pipeto v vsako vdolbinico odpipetirali 2 ml svežega gojišča s 5% FBS, segretega na 37°C. Pri tem smo pazili, da curek svežega gojišča ni bil usmerjen neposredno na površino preraščeno s celicami. Pustili smo, da so se celice namnožile do ~90% konfluentnosti; celice bi se sicer delile dokler ne bi prerasle celotne površine vdolbinice v eni sklenjeni plasti -t.i. konfluentna kultura (takrat se med celicami vzpostavijo medcelični stiki in delitve se ustavijo). Pred izvedbo poskusa smo celicam odsesali gojišče s 5% FBS, ga zamenjali za na 37°C segreto gojišče brez FBS in jih 2 uri pustili v celičnem inkubatorju.

Izvedba poskusa in kolekcija celic

Celice so bile pripravljenim tretmajem izpostavljene 4 ure ali 24 ur, odvisno od tega ali smo določali izločanje vnetnih in adhezijskih molekul iz celic (proteinski nivo) ali izražaje genov za tovrstne molekule v celicah (mRNA nivo). Po 4 ali 24 urah smo plošče s celicami vzeli iz inkubatorja, supernatant nad celicami s pipeto prenesli v pripravljene avtoklavirane epice in jih centrifugirali 5 minut na 5000 g. Zgornjih 850 µl supernatanta smo nato odpipetirali v sveže epice, jih označili in shranili v skrinji na -20°C. V vdolbinice s celicami smo po odstranitvi supernatanta nanegli po 350 µl lizirajočega pufra iz analiznega kompleta za izolacijo RNA. S strgalci smo celice postrgali z dna vdolbinic in jih s pufrom vred prenesli v naprej pripravljene epice. Lizirajoči puffer vsebuje gvanidinijev tiocianat, ki kot kaotropni reagent povzroči tudi denaturacijo in s tem izgubo encimske aktivnosti RNaz. Z dodatkom omenjenega pufra smo tako ne samo lizirali celice, ampak obenem tudi zaščitili v celicah prisotno RNA pred razgradnjo. Celice smo na ta način pripravili za

izolacijo RNA; v kolikor izolacije RNA nismo izvajali isti dan, smo epice s celičnimi lizati shranili v skrinji na -80°C.

3.2.5 Določanje koncentracije vnetnih in adhezijskih molekul

Izločanje vnetnih in adhezijskih molekul iz celic smo določali z encimsko imunskim testom na trdnem nosilcu. Supernatante nad celicami smo testirali s pomočjo analiznih kompletov za določanje človeškega IL-6 z encimskoimunsko metodo (Human IL-6 Immunoassay kit) in za določanje človeške žilne celične adhezijske molekule (VCAM-1 Human Elisa Kit). Pri delu smo se držali postopkov predpisanih s strani proizvajalca (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

3.2.6 Določanje izražanja tarčnih genov

Kljub temu da vsaka celica kateregakoli tkiva vsebuje celoten genski material, se v njej v določenem trenutku izraža le peščica vseh genov. Kateri geni se bodo v nekem trenutku izražali v celici, je odvisno od vrste celice, njene razvojne stopnje in od pogojev, ki jim je celica izpostavljena [39]. Da bi določili izražanje tarčnih genov smo iz celičnega lizata najprej izolirali nabor vseh molekul mRNA, jih prevedli v stabilnejše molekule cDNA, nato pa te analizirali s pomočjo verižne reakcije s polimerazo v realnem času.

Izolacija RNA, določanje njene koncentracije in čistosti

RNA iz celičnega lizata smo izolirali s pomočjo analiznega kompleta za izolacijo RNA (RNeasy® Plus Micro kit) po navodilih proizvajalca. Koncentracijo in čistost RNA smo določili spektrofotometrično. 2,3 µl izolirane RNA smo razredčili v 67,7 µl vode (30,4-kratno redčenje) in tako pripravljenim vzorcem merili absorbanco pri 260 in 280 nm. Iz izmerjene absorbance pri 260 nm smo, upoštevajoč redčitev, izračunali koncentracijo RNA v vzorcu po enačbi 2 (vzorec, ki vsebuje 40 mg/l RNA, ima namreč pri 260 nm absorbanco enako 1):

$$c_{RNA} = 40 \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] \times A_{260} \times \text{faktor redčenja}$$

Enačba 2: Izračun koncentracije RNA v vzorcu na podlagi izmerjene absorbance. c_{RNA} -koncentracija RNA v vzorcu, A_{260} -absorbanca vzorca pri 260 nm.

Za nadaljnjo reakcijo z reverzno transkriptazo smo potrebovali 15,6 µl raztopine RNA, v kateri je moral biti 1 µg izolirane RNA. Iz koncentracije RNA v vzorcu smo izračunali volumen vzorca, v katerem se nahaja 1 µg RNA, temu pa dodali vodo brez RNaz do končnega volumna 15,6 µl. Čistost RNA smo ocenili iz razmerja absorbanc pri 260 in 280

nm - A_{260}/A_{280} pri čisti RNA je 2,0. Nižje vrednosti nakazujejo na prisotnost nečistot kot so DNA (pri čisti DNA je razmerje A_{260}/A_{280} enako 1,8) ali proteini. Po izkušnjah laboratorija razmerje nad 1,5 pomeni relativno dobro čistost RNA, izolirane po postopku kot ga navaja proizvajalec analiznega kompleta.

Obratna transkripcija

Molekule RNA so zelo občutljive na delovanje RNaz in se v njihovi prisotnosti hitro razgradijo. Zaradi lažjega rokovanja zato enoverižno RNA s pomočjo encima reverzne transkriptaze prevedemo v komplementarno dvoverižno DNA (cDNA). Za reakcijo obratne transkripcije smo pripravili 30 μ l reakcijske mešanice, katere sestava je podana v preglednici IV.

Preglednica IV: Sestava reakcijske mešanice za obratno transkripcijo in vloga posameznih sestavin. RT pufer-pufer za obratno transkripcijo, dNTP-deoksiribonukleotidtrifosfati, AMV RT- encim reverzna transkriptaza.

SESTAVINA	VLOGA	KOLIČINA ZA 1 VZOREC
10x RT pufer	vzdržuje pH	3 μ l
dNTP	gradniki cDNA	3 μ l
MgCl ₂	Mg ²⁺ je kofaktor encima RT	6 μ l
oligo dT	oligonukleotidni začetniki	1 μ l
inhibitor RNaz	zaščita RNA matrice	0,75 μ l
AMV RT	encim, ki katalizira izgradnjo cDNA	0,6 μ l
H ₂ O brez nukleaz	dopolnilo	0,05 μ l
vzorec RNA z 1 μ g RNA	vir RNA	15,6 μ l

} 14,4 μ l } 30 μ l

Reakcija je potekala pod naslednjimi pogoji: 30 minut pri 43°C, 30 minut pri 53°C in 5 minut pri 94°C. V tem času reverzna transkriptaza katalizira najprej sintezo DNA na osnovi RNA matrice in nato še izgradnjo druge verige DNA. Vzorce z nastalo cDNA smo, v primeru da verižne reakcije s polimerazo nismo izvajali isti dan, shranili v skrinji na -20°C.

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

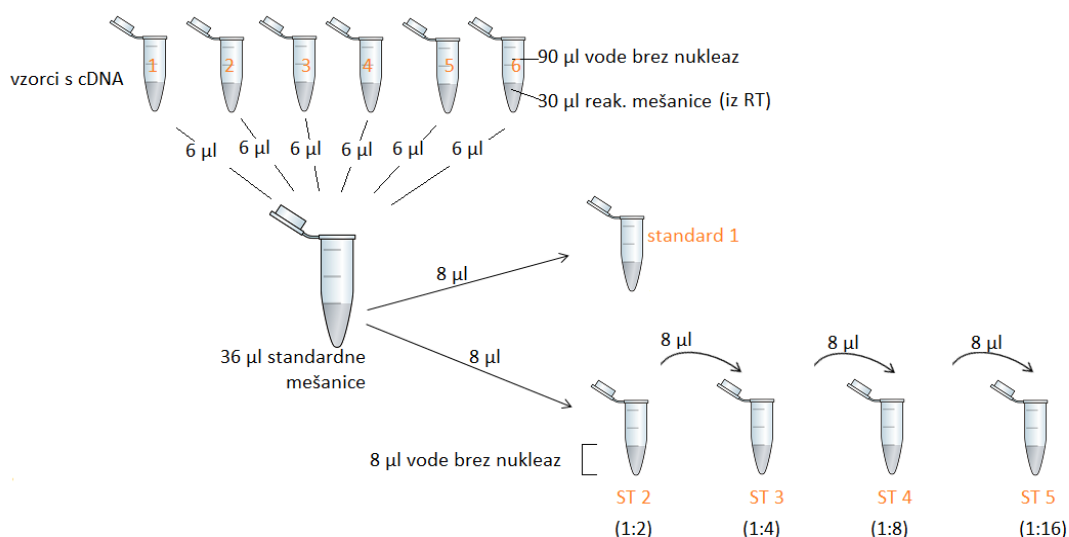
Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) lahko pomnožimo točno določen fragment DNA do ogromnega števila kopij. PCR v realnem času ali kvantitativni PCR (qPCR) za razliko od klasičnega omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu že med reakcijo [37]. Za izvedbo reakcije smo uporabili komplet za verižno reakcijo s polimerazo Power SYBR Green (Power SYBR Green PCR Master Mix). Reakcijsko mešanico smo pripravili tako kot prikazuje preglednica V. Katera molekula cDNA iz vzorca se bo pomnožila je odvisno

od para dodanih oligonukleotidnih začetnikov. Spodaj omenjeni *Power Sybr Green PCR Master Mix* že vsebuje za reakcijo potreben encim (termostabilno DNA-polimerazo) in gradnike dNTP (deoksiribonukleotidtrifosfate) ter za detekcijo potrebno barvilo Sybr green I. Za slednjega je značilno, da fluorescira, ko se interkalira med dvojno vijačnico DNA.

Preglednica V: Sestava reakcijske mešanice za qPCR (navedene so količine za 1 vzorec). F in R-smiselni in protismiselni oligonukleotidni začetnik.

SESTAVINA	KOLIČINA
Power Sybr Green Master Mix	12,5 μ l
F oligonukleotidni začetnik	0,5 μ l
R oligonukleotidni začetnik	0,5 μ l
voda brez nukleaz	7,5 μ l

Pripravljeno reakcijsko mešanico smo nanesli v vdolbinice na ploščici (21 μ l/vdolbinico) in ji dodali bodisi 4 μ l vzorca s cDNA bodisi 4 μ l standarda ali v primeru slepe kontrole 4 μ l vode brez nukleaz. Priprava standardov je prikazana na sliki 9.



Slika 9: Priprava standardne mešanice in standardov za qPCR. ST-raztopina standarda, RT-obratna transkripcija.

S pomočjo računalniškega programa StepOne (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) smo določili razporeditev vzorcev, standardov in slepih kontrol na ploščici (vse smo nanašali v dvojnikih). Prav tako smo nastavili pogoje reakcije: 10-minutno segrevanje na 95°C, nato 40 ciklov, pri čemer je vsak izmed teh sestavljen iz 3 korakov (denaturacije, prileganja in pomnoževanja DNA). cDNA se toplotno denaturira v prvih 15 sekundah na 95°C, prileganje oligonukleotidnih začetnikov poteka 1 minuto pri temperaturi prileganja oligonukleotidnih začetnikov, pomnoževanje fragmenta DNA, katerega robove določata uporabljena začetnika, pa poteka 1 minuto pri

60°C. Nukleotidno zaporedje uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov in njihove temperature T(°C) prileganja so podane v preglednici II v podpoglavju *Materiali*.

Računalniški program nam je v vsakem ciklu izmeril fluorescenco v posameznem vzorcu in izrisal krivuljo, ki podaja fluorescenco v odvisnosti od števila ciklov. Na eksponentnem delu te krivulje smo določili prazno fluorescenco, t.j. tisti odziv, kjer je jakost fluorescence značilno višja od ozadja. Ob koncu reakcije nam je program za vsak vzorec izpisal cikel Ct (*angl. threshold cycle*), v katerem je fluorescenca vzorca presegla nastavljen prag. Več kot je bilo začetnih molekul DNA, hitreje je fluorescenca vzorca dosegla prazno; vrednosti Ct so torej obratno sorazmerne z začetnim številom molekul matrične DNA. Pri obdelavi dobljenih podatkov smo si pomagali z računalniškim programom QGene. V tabele smo poleg podatkov za tarčni gen vnesli še podatke za referenčni gen, za katerega je značilno enakomerno in od dražljajev v okolici neodvisno izražanje. Referenčni gen oziroma t.i. endogena kontrola v našem primeru je bil gen za beta aktin. Iz naklona standardne krivulje (graf odvisnosti Ct od logaritma začetne količine DNA v standardu) nam je program za vsako reakcijo pomnoževanja izračunal učinkovitost pomnoževanja (E) po enačbi 3:

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{naklon standard.krivulje}}\right)} - 1$$

Enačba 3: Izračun učinkovitosti pomnoževanja.

Ob upoštevanju le-te smo nato izražanje tarčnega gena v celicah normalizirali glede na izražanje referenčnega gena po enačbi 4:

$$N = \frac{X_0}{R_0} = \frac{(1 + E_R)^{Ct(R)}}{(1 + E_X)^{Ct(X)}} \quad ,$$

Enačba 4: Normalizacija oziroma izračun razmerja med številom kopij tarčnega in referenčnega gena pred pričetkom pomnoževanja.

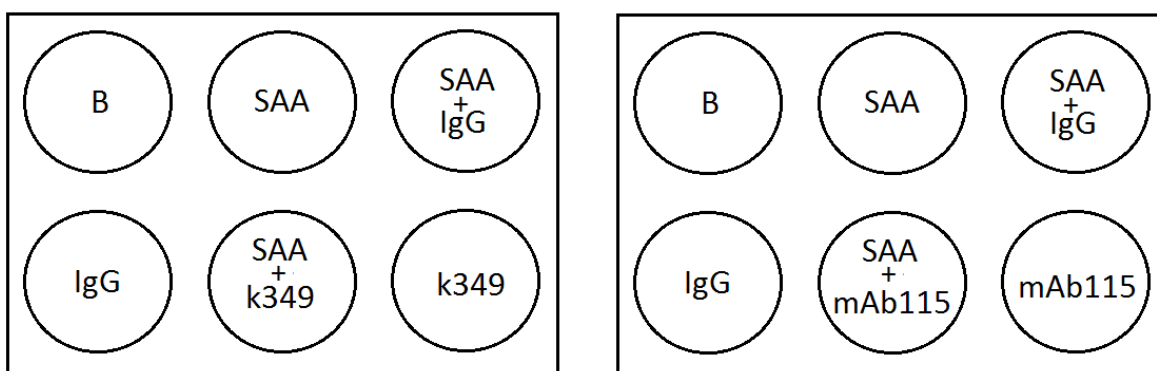
kjer je N normalizirano razmerje, X_0 in R_0 število kopij tarčnega in referenčnega gena v vzorcu pred pomnoževanjem, E_X in E_R sta učinkovitosti pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena, $Ct(X)$ in $Ct(R)$ pa cikla, v katerem je fluorescenca vzorca ob pomnoževanju tarčnega oziroma referenčnega gena presegla prazno. V primeru da sta učinkovitosti pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena enaki ali celo stodontni, se lahko zgornja enačba nadalje poenostavi. Po obdelavi podatkov smo tako kot končni rezultat dobili graf, ki prikazuje povprečno na beta aktin normalizirano izražanje tarčnega gena v vsakem vzorcu.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

Pri eksperimentalnem delu smo poleg testiranj serumov bolnikov izvedli tudi nekaj poskusov, s katerimi smo želeli ovrednotiti zamisli o morebitni (pato)fiziološki funkciji protiteles proti serumskemu amiloidu A.

4.1 POSKUSI NA CELICAH

Lakota in sodelavci [40] so pokazali, da človeške endotelijske celice koronarne arterije (HCAEC) po stimulaciji s SAA povečajo izločanje IL-6, IL-8, medcelične adhezijske molekule-1 in žilne celične adhezijske molekule-1 ter da je izločanje teh molekul tem večje, čim višja je uporabljena koncentracija SAA [40]. Da bi ugotovili, ali lahko s človeškimi anti-SAA protitelesi zmanjšamo oziroma zavremo s SAA spodbujen vnetni odziv HCAEC, smo poskuse zasnovali tako kot prikazujeta slika 10 in preglednica VI.



Slika 10: Tretmaji v posamezni vdolbinici 6-prekatne ploščice. B-ozadje, k349-serum krvodajalca, mAb 115-mišje monoklonsko protitelo proti človeškemu rekombinantnemu SAA, IgG-IgG frakcija z znanim odzivom na anti-SAA protitelesa, izolirana iz seruma zdravega krvodajalca.

V poskusih smo uporabili iz seruma zdravega krvodajalca izolirano IgG frakcijo protiteles z visokim odzivom na anti-SAA protitelesa (tega smo predhodno določili z anti-SAA ELISA), mišje monoklonsko protitelo proti SAA- SAA(115) ter celoten serum zdravega krvodajalca. SAA je bil uporabljen v koncentracijah, ki so v predhodnih študijah [40] izzvale znaten vnetni odziv HCAEC, oziroma za katere se predvideva, da so patofiziološko pomembne. Glede na uporabljenjo koncentracijo SAA smo izračunali približno koncentracijo anti-SAA protiteles (razreda IgG), ki bi jih morali dodati, da bi zagotovili vezavo antigena s protitelesom v razmerju 2:1 (IgG so namreč divalentni). Upoštevali smo približne molekulske mase: 12 kDa za SAA in 150 kDa za IgG. Ob predpostavki, da

vsaj 5% IgG frakcije predstavljajo anti-SAA protitelesa, bi zadostoval ~125-kratni masni prebitek IgG. Koncentracija izhodne raztopine SAA je bila 1g/l, za izolirano IgG frakcijo pa smo imeli podatek, da vsebuje ~3,8 g/l proteinov. Mišje monoklonsko protitelo (mAb 115) smo uporabili v koncentraciji, za katero je bilo v predhodnih poskusih pokazano, da zadostno izniči z SAA posredovane učinke (pozitivna kontrola). Natančne količine sestavin v posameznih tretmajih podaja preglednica VI.

Preglednica VI: Sestava posameznih tretmajev. B-ozadje, V-volumen, Ab-protitelo, k349-serum krvodajalca, mAb 115-mišje monoklonsko protitelo proti človeškemu rekombinantnemu SAA, IgG-IgG frakcija z znanim anti-SAA odzivom, izolirana iz seruma zdravega krvodajalca.

POSKUS	TRETMA	KONCENTRACIJA	V (gojišča)	V(SAA)	V(Ab)	V (seruma)
# 1	B	-	1000 µl	/	/	/
	SAA	500 nM SAA	1000 µl	6 µl	/	/
	SAA + IgG *	500 nM SAA + 5000 nM IgG	900 µl	6 µl	100 µl	/
	IgG	5000 nM IgG	900 µl	/	100 µl	/
	SAA +krv 352	500 nM SAA +serum	950 µl	6 µl	/	50 µl
	krv 352	-	950 µl	/	/	50 µl
# 2	B	-	1000 µl	/	/	/
	SAA	1000 nM SAA	990 µl	12 µl	/	/
	SAA + IgG **	1 µM SAA + 10 µM IgG	790 µl	12 µl	200 µl	/
	IgG	10 µM IgG	800 µl	/	200 µl	/
	SAA + mAb115	1 µM SAA + 2 µg/ml	970 µl	12 µl	20 µl	/
	mAb115	2 µg/ml	980 µl	/	20 µl	/

* 30 min predinkubacije

** 2 uri predinkubacije

4.2 POSKUSI ZA UGOTAVLJANJE HIDROLITIČNE FUNKCIJE

Da bi preverili, ali anti-SAA protitelesa posedujejo hidrolitično sposobnost, smo SAA čez noč in pri temperaturi $T=37^{\circ}\text{C}$ inkubirali z IgG frakcijo z visokim odzivom na anti-SAA protitelesa ter vzorce nato analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. V žepke poliakrilamidnega gela smo nanegli vzorce, ki smo jih pripravili tako kot prikazujeta preglednici VII in VIII. Vzorcem smo pred nanosom dodali reducirajoči SDS pufer in jih v segrevali 5 minut pri 95°C .

Preglednica VII: Sestava vzorcev. SC-označevalec molekulske mase SantaCruz®, PBS-s fosfatnim pufrom pufrana slanica. Koncentracija izhodne raztopine SAA: 1g/l, koncentracija IgG v IgG frakciji s poznanim anti-SAA odzivom: 3,8 g/l (IgG (1)) in 4,9 g/l (IgG(2)).

POSKUS #1						
DETEKCIJA S Comassie Brilliant Blue				IMUNSKA DETEKCIJA		
0	1	2	3	4	5	6
3 µl SC	5 µl SAA 20 µl PBS	5 µl SAA 20 µl IgG(1)	5 µl SAA 20 µl IgG(2)	5 µl SAA 20 µl PBS	5 µl SAA 20 µl IgG(1)	5 µl SAA 20 µl IgG(2)
inkubacija čez noč						
+ 8 µl reducirajočega SDS pufra						

Preglednica VIII: Sestava vzorcev. PBS-s fosfatnim pufrom pufrana slanica. Koncentracija izhodne raztopine SAA: 1g/l, koncentracija IgG v IgG frakciji s poznanim anti-SAA odzivom: 3,8 g/l (IgG (1)) in 4,9 g/l (IgG(2)).

POSKUS #2						
IMUNSKA DETEKCIJA						
1	2	3	4	5	6	7
5 µl SAA 20 µl PBS	5 µl SAA 20 µl IgG(1)	5 µl SAA 20 µl IgG(2)	5 µl SAA 20 µl IgG(3)	5 µl PBS 20 µl IgG(1)	5 µl PBS 20 µl IgG(2)	5 µl PBS 20 µl IgG(3)
inkubacija čez noč						
+ 8 µl reducirajočega SDS pufra						
8						
42 µl SAA						
168 µl IgG(1)						
inkubacija čez noč						
+ 67,5 µl reducirajočega SDS pufra						

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

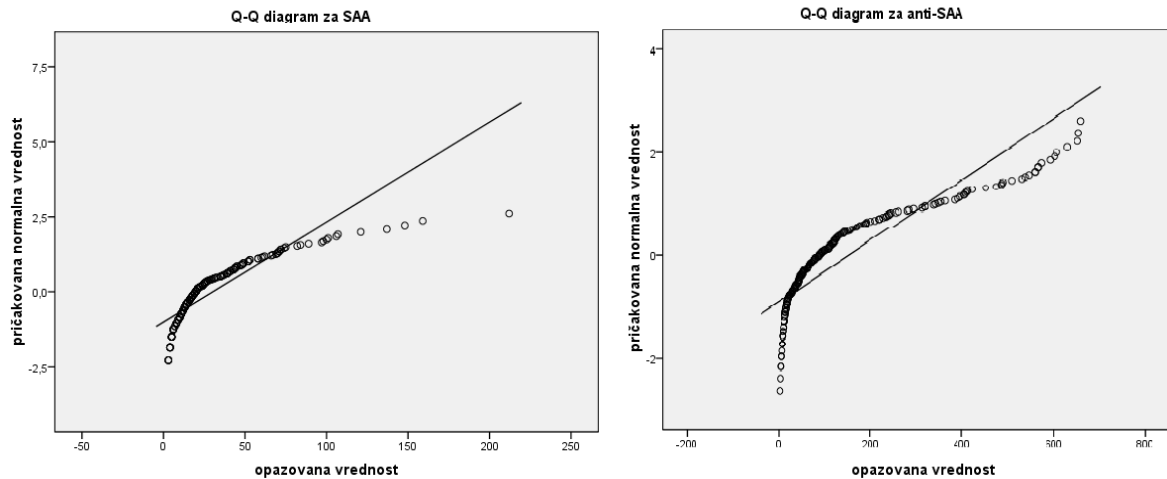
Kljub temu, da je vnetje življenjsko pomemben obrambni mehanizem preko katerega imunski sistem vzdržuje integriteto organizma, se vse bolj zavedamo tudi vpletenosti vnetja v nastanek, razvoj in napredovanje različnih bolezni. Vnetje je koristno le, dokler je časovno omejeno in natančno uravnano. Nenadzorovano in kronično vnetje vodi v poškodbo tkiv [24]. Pri prepoznavanju vnetnih obolenj in ločevanju med vnetnimi in ne-vnetnimi stanji so nam v veliko pomoč vnetni kazalci. Serumski amiloid A (SAA) se kot tak še ni uveljavil, čeprav mu študije v zadnjih letih namenjajo vse več pozornosti. Ker je zvišanje koncentracij SAA pogosto večje in hitrejše kot zvišanje koncentracij CRP, omogoča večjo občutljivost merjenja, zaradi razpolovnega časa manj kot 24 ur pa tudi hitro zaznavanje vnetnih sprememb in odziva na predpisano protivnetno terapijo [11]. SAA je tudi tarča imunskega odziva – nedavno potrjena prisotnost anti-SAA protiteles pri zdravih krvodajalcih nakazuje, da so najverjetneje del repertoarja naravnih avtoprotiteles [12]. Zato je bil naš prvi cilj, da določimo in primerjamo ravni SAA in anti-SAA protiteles med skupinami bolnikov z različnimi vnetnimi boleznimi.

5.1 DOLOČANJE IN PRIMERJAVA VREDNOSTI SAA IN PROTITELES PROTI SAA V PRESEČNI ŠTUDIJI

5.1.1 Določanje referenčnih vrednosti za SAA in anti-SAA protitelesa

V presečni študiji smo določali nivoje SAA in anti-SAA protiteles v serumih bolnikov z bakterijsko infekcijo ($n = 30$), virusno okužbo ($n = 20$), kardiovaskularno boleznijo ($n = 26$), rakom ($n = 18$) in zgodnjim revmatoidnim artritisom ($n = 12$). Serumski bolnikov z zgodnjim revmatoidnim artritisom so bili odvzeti pred pričetkom zdravljenja (časovna točka 0) in tako predstavljajo skupino bolnikov z avtoimunsko vnetno boleznijo, v kateri morebiti znižane koncentracije SAA niso posledica protivnetne terapije. Obdelali smo tudi podatke za večjo skupino zdravih krvodajalcev ($n = 219$), saj SAA še ni standardiziran kot pokazatelj vnetja in zanj torej niso določene referenčne vrednosti, še manj pa so te vrednosti poznane za anti-SAA protitelesa.

Normalnost porazdelitve podatkov smo preverili s Shapiro-Wilk-ovim testom, pri čemer smo kot statistično značilno vrednost upoštevali $p < 0,05$. Ker se podatki niso porazdeljevali normalno (slika 11), smo nadalje za primerjavo skupin bolnikov uporabljali ne-parametrične teste (ne predpostavljajo nobene porazdelitve vrednosti).



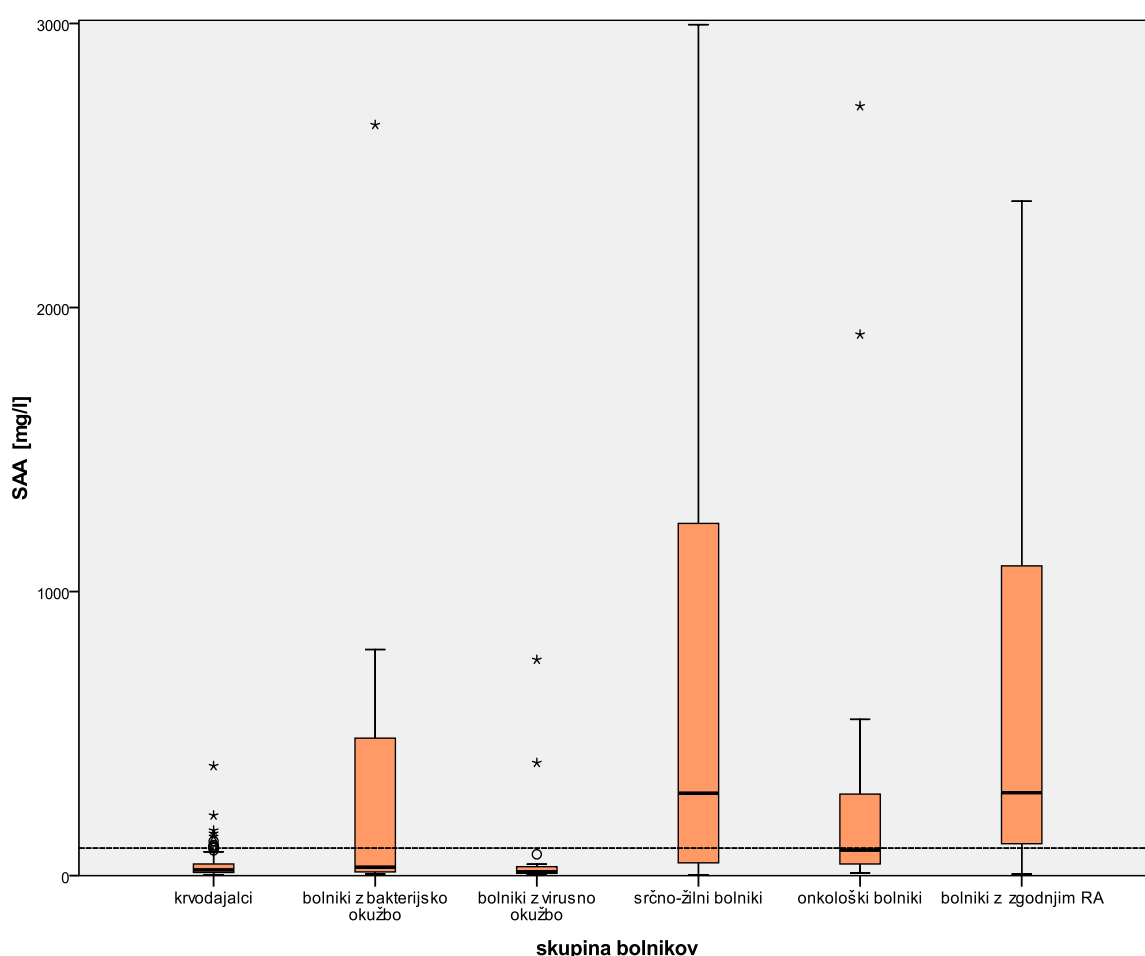
Slika 11: Q-Q diagram za vrednosti SAA in anti-SAA protiteles v zdravi populaciji. Diagram podaja grafično oceno prileganja poljubne populacije normalni porazdelitvi; dobljene vrednosti in pričakovane vrednosti istih kvantilov v normalni porazdelitvi predstavljajo urejene pare. V primeru, da se podatki porazdeljujejo normalno, ležijo točke na premici $y=x$.

Medtem ko je znano, da bodo vrednosti SAA v skupini bolnikov z vnetnimi boleznimi odstopale od vrednosti, določene pri zdravih krvodajalcih, le v eni smeri (navzgor), tega za anti-SAA protitelesa ne moremo trditi. Če so res del NAb's repertoarja, bi pričakovali podobne vrednosti znotraj skupine krvodajalcev in morebitne odklone (navzgor ali navzdol) v skupinah bolnikov z vnetnimi boleznimi. Kot pražno vrednost (»cut-off«) za SAA smo zato upoštevali 95. percentilo ($c=97$ mg/l) pri krvodajalcih določenih vrednosti, za anti-SAA protitelesa pa smo postavili spodnjo in zgornjo mejo (5. in 95. percentilo). Vrednosti znotraj tega območja (od 8-560 arbitrarnih enot) smo upoštevali kot fiziološke, vrednosti nad ali pod temi mejami pa kot nefiziološke.

5.1.2 Vrednosti SAA v posameznih skupinah bolnikov

Središčna vrednost za SAA, določena v skupini krvodajalcev, je bila 20 mg/l in je primerljiva z vrednostmi, določenimi v dosedanjih študijah [41]. Mediane, določene v skupinah bolnikov z bakterijskimi okužbami, srčno-žilnimi boleznimi, rakom in zgodnjim revmatoidnim artritisom, so bile višje od te vrednosti (slika 12). Da se vrednosti SAA pri obravnavanih bolnikih statistično značilno razlikujejo od tistih pri krvodajalcih, je potrdil tudi Mann Whitney-ev U test (preglednica IX). Opažene razlike so povsem razumljive, saj je SAA zelo občutljiv, a za bolezen nespecifičen pokazatelj vnetja. Čeprav je znano, da je povišanje koncentracij SAA pri bakterijskih infekcijah precej višje kot pri virusnih infekcijah, smo pri slednjih vseeno pričakovali nekoliko višje vrednosti SAA. Kljub temu da so virusi obvezni znotrajcelični mikroorganizmi, ki kot taki povzročijo manjše

poškodbe tkiva in s tem blažji vnetni odziv kot številne bakterije, mnoge študije namreč poročajo, da je SAA dovolj občutljiv pokazatelj vnetja tudi v primeru virusnih infekcij [14,42,43]. Zato smo pričakovali, da bo večina vrednosti SAA, določenih v skupini bolnikov z virusno okužbo, nad prazno vrednostjo za SAA, vendar so bile, z izjemo dveh ekstremnih vrednosti, vse določene vrednosti nižje od 97 mg/l. Ob tem morda ne gre spregledati dejstva, da večina omenjenih študij poroča o SAA kot vnetnem kazalcu v primeru akutnih virusnih okužb, v našem vzorcu (n = 20) pa je imela polovica bolnikov virusni hepatitis C, ki velikokrat poteka brez znakov bolezni. Poleg tega so tudi v eni od dosedanjih študij ugotovili, da so pri bolnikih z virusnim hepatitisom C vrednosti SAA pod prazno [14].



Slika 12: Razpršenost vrednosti SAA znotraj posameznih skupin bolnikov. Odebeljena črta znotraj obarvanih okvirjev predstavlja mediano za posamezno skupino. ° izstopajoča vrednost, *skrajna vrednost. Zaradi večje preglednosti se os y konča pri 3000 [mg/l]. 95. percentila pri krvodajalcih določenih vrednosti.

Podobno bi veljalo razmisliti za bolnike z bakterijsko infekcijo. Čeprav se vrednosti v tej skupini statistično značilno razlikujejo od tistih pri krvodajalcih, je mediana razmeroma

nizka, če upoštevamo, da ob bakterijskih infekcijah vrednosti SAA pogosto presežejo 1000 in več mg/l [7]. V naši skupini bolnikov z bakterijsko infekcijo smo le pri 8 od 30 določili vrednosti SAA nad 97 mg/l, od tega pri 6 nad 1000 mg/l. Vrednosti SAA nad 1000 mg/l so se pojavljale izključno v tisti podskupini bolnikov (n=10), za katero nismo imeli podatka o povzročitelju, medtem ko smo le pri enem od 20 bolnikov z boreliozo določili vrednost SAA nad postavljeno mejo. Zanimivo je, da so bile vse preostale vrednosti celo nižje od 50 mg/l, ne glede na to, ali je šlo za akutno (n=10) ali kronično (n=10) obliko bolezni (podatki niso prikazani). Kljub temu, da smo v večini primerov imeli podatke o povzročitelju, skupin bolnikov z bakterijskimi in virusnimi infekcijami nismo razdelili natančneje (v podskupine), saj bi bile tako dobljene skupine premajhne za tehtne zaključke.

Preglednica IX: Mediane za SAA v posameznih skupinah bolnikov in p-vrednost, dobljena z Mann-Whitney-evim U testom; statistično značilne razlike so prikazane s krepkim tiskom (p<0,05).

SKUPINA	mediana SAA [mg/l]	p (Mann-Whitney U)
BAKTERIJSKA OKUŽBA (n=30)	30	0,012
VIRUSNA OKUŽBA (n=20)	14	0,285
SRČNO-ŽILNE BOLEZNI (n=26)	291	0,000
RAK (n=18)	90	0,000
REVMATOIDNI ARTRITIS (n=12)	292	0,000
KRVODAJALCI (n=219)	20	

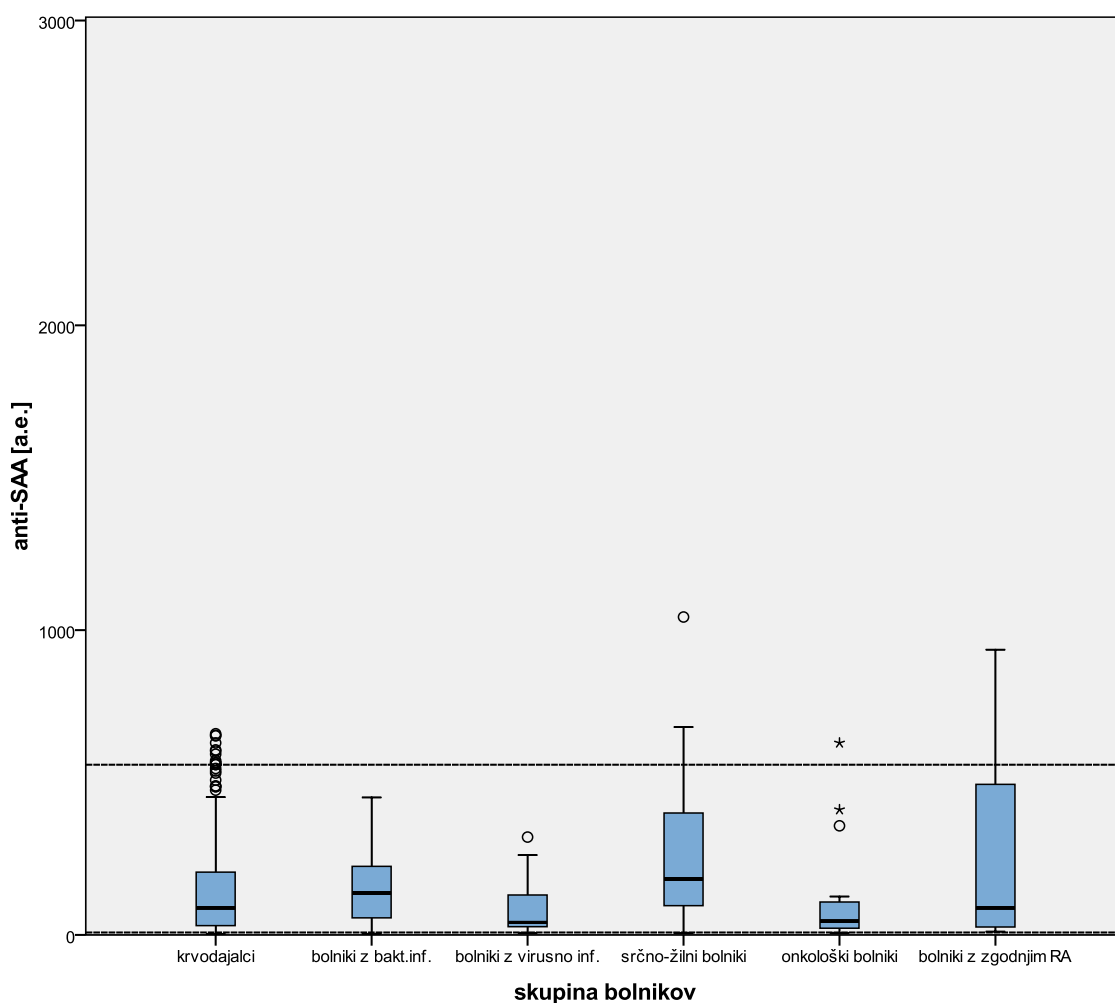
Po pričakovanjih smo najvišje središčne vrednosti za SAA določili v skupinah bolnikov s kroničnimi vnetnimi stanji, t.j. s srčno-žilnimi boleznimi, z rakom in revmatoidnim artritisom. Ugotovitve so skladne s študijami, ki poročajo o povišanih vrednostih SAA pri teh bolnikih [7,10,16-18] in zaradi tega tudi o možni uporabnosti SAA za spremljanje poteka revmatoidnega artritisa [16] ter za napovedovanje srčno-žilnih zapletov [17], smrtnosti po akutnih miokardnih infarktih [18] in slabega izida pri rakavih bolnikih [10].

Za nadaljnjo analizo podatkov bi bilo morda smiselno pridobiti tudi informacije o predpisani terapiji in morebitni soobolevnosti obravnavanih bolnikov. Določena zdravila lahko namreč znižajo vnetne parametre. Statini, ki zmanjšujejo tveganje za srčno-žilne zaplete, delujejo npr. tudi protivnetno. Po drugi strani pa lahko bolezni, ki so pridružene osnovni, prav tako pripomorejo h kroničnemu vnetju. Bolniki z avtoimunskimi boleznimi imajo npr. pogosto tudi srčno-žilno obolenje. Zanimivo bi bilo imeti tudi več kliničnih podatkov za skupino onkoloških bolnikov (stadij, tip raka), saj smo pri polovici od njih določili SAA pod prazno vrednostjo. V študiji, ki so jo opravili Biran in sodelavci [44], so

npr. ugotovili, da pri raku nivoji SAA dobro korelirajo s stadijem bolezni in da so pri pljučnem raku, v primerjavi z ostalimi tipi raka, na splošno višji.

5.1.3 Nivoji anti-SAA protiteles v posameznih skupinah bolnikov

Če primerjamo za anti-SAA protitelesa določeno središčno vrednost v posameznih skupinah bolnikov (slika 13) z mediano, določeno pri krvodajalcih, vidimo, da je nižja pri onkoloških bolnikih in bolnikih z virusno infekcijo, višja pri bolnikih z bakterijsko okužbo in srčno-žilnih bolnikih, pri bolnikih z zgodnjim revmatoidnim artritisom pa približno enaka kot pri krvodajalcih. Kljub opaženim razlikam se je izkazalo, da je bil odklon statistično značilen le pri bolnikih s srčno-žilnimi boleznimi (razvidno iz preglednice X). Tako bi našo hipotezo, da vnetne bolezni spremlja odklon v nivoju anti-SAA protiteles v primerjavi z nivoji, določenimi pri zdravih krvodajalcih, lahko potrdili samo pri srčno-žilnih bolnikih.



Slika 13: Vrednosti anti-SAA protiteles znotraj posameznih skupin bolnikov. Odebeljena črta znotraj obarvanih okvirjev predstavlja mediano za posamezno skupino. ° izstopajoča vrednost, *skrajna vrednost,5. in 95. percentila pri krvodajalcih določenih vrednosti.

Pri postavitvi hipoteze smo izhajali iz tega, da so pri mnogih boleznih opažena značilna kvantitativna odstopanja v nivojih posameznih NAbS [22,25]. To bi lahko veljalo tudi za anti-SAA protitelesa pri vnetnih boleznih. Vse vnetne bolezni namreč spremljajo povišane vrednosti SAA, nastajanje in izločanje naravnih avtoproteles pa je po vsej verjetnosti nadzorovano z nastajanjem in razgradnjo antigenov [25].

Preglednica X: Mediane za anti-SAA protitelesa v posameznih skupinah bolnikov in p-vrednost, dobljena z Mann Whitney-evim testom; statistično značilne razlike so prikazane s krepkim tiskom (p<0,05).

SKUPINA	mediana za anti-SAA [a.e.]	p (Mann-Whitney U)
BAKTERIJSKA OKUŽBA (n=30)	138	0,272
VIRUSNA OKUŽBA (n=20)	41	0,151
SRČNO-ŽILNE BOLEZNI (n=26)	184	0,007
RAK (n=18)	46	0,152
REVMATOIDNI ARTRITIS (n=12)	89	0,669
KRVODAJALCI (n=219)	88	

Ker so bile središčne vrednosti za SAA v skoraj vseh skupinah značilno višje kot pri krvodajalcih, je zanimivo, da za mediane anti-SAA protiteles to ne velja. Res pa je, da so mediane položajne srednje vrednosti, ki niso občutljive na skrajne vrednosti. Zato je morda skupine bolje primerjati glede na to, kolikšen delež vseh določenih vrednosti anti-SAA protiteles je bil znotraj ali izven fiziološkega območja (preglednica XI).

Preglednica XI: Prisotnost anti-SAA protiteles znotraj in izven fiziološkega območja v posameznih skupinah bolnikov.

SKUPINA	NIVOJI anti-SAA PROTITELES		
	FIZIOLOŠKI	POD FIZIOLOŠKIMI	NAD FIZIOLOŠKIMI
BAKTERIJSKA OKUŽBA	29/30 (96,7%)	1/30 (3,3%)	0
VIRUSNA OKUŽBA	18/20 (90,0%)	2/20 (10,0%)	0
SRČNO-ŽILNE BOLEZNI	23/26 (88,5%)	1/26 (3,8%)	2/26 (7,7%)
RAK	16/18 (89,0%)	1/18 (5,5%)	1/18 (5,5%)
REVMATOIDNI ARTRITIS	10/12 (83,3%)	0	2/12 (16,7%)
KRVODAJALCI	22/219 (90,0%)	11/219 (5,0%)	11/219 (5,0%)

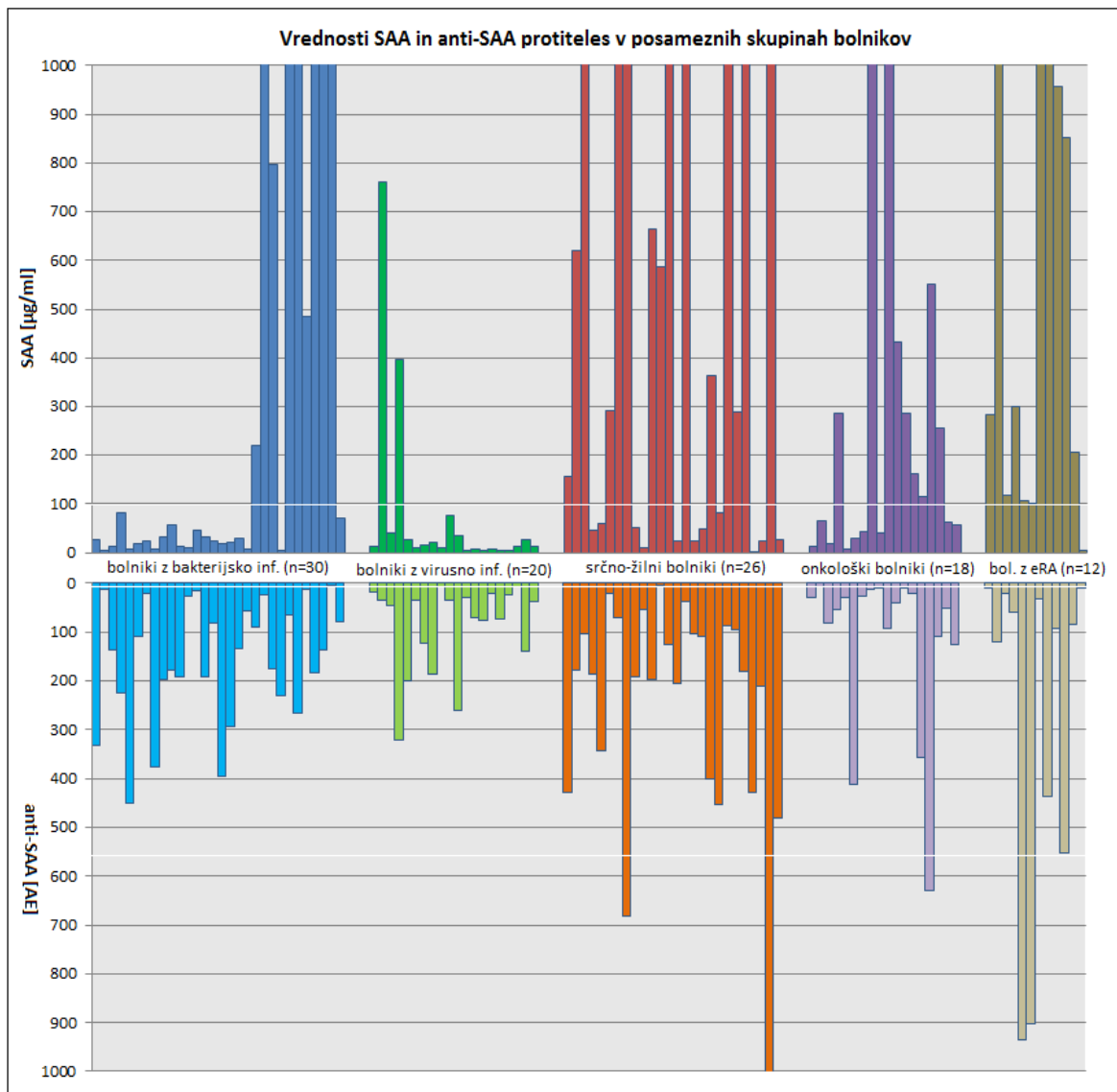
Iz preglednice XI je tako razvidno, da so anti-SAA protitelesa prisotna nad fiziološkimi vrednostmi le pri bolnikih z zgodnjim revmatoidnim artritisom, rakom in s srčno-žilnimi

boleznimi. Hkrati smo ravno pri teh bolnikih določili tudi najvišje mediane za SAA oz. pri bolnikih s srčno-žilnimi boleznimi in zgodnjim revmatoidnim artritisom ugotovili tudi največ zelo visokih vrednosti SAA. To bi lahko nakazovalo na zaščitno vlogo anti-SAA protiteles ob kroničnih vnetnih stanjih in na možnost, da sodelujejo pri odstranjevanju antigena. Vrednosti anti-SAA protiteles pri infekcijskih boleznih niso bile nikoli višje od fizioloških. Pri virusnih infekcijah to ni nenavadno, če se spomnimo, da v tej skupini bolnikov tudi nismo opazili povišanih nivojev SAA. Pri bakterijskih infekcijah bi si to lahko razlagali z akutnim vnetnim stanjem pri večini bolnikov. Povsem možno je, da šele dolgotrajno povišane vrednosti SAA privedejo do sprememb v nivoju anti-SAA protiteles. Prav tako je zanimivo, da le pri bolnikih z revmatoidnim artritisom vrednosti anti-SAA protiteles niso bile nikoli pod fiziološkimi.

Če so anti-SAA protitelesa vključena v odstranjevanje antigena, bi lahko znižani nivoji teh protiteles nakazovali tudi na nezmožnost odstranjevanja SAA [12]. Da bi dobili vpogled v odnos med nivoji anti-SAA protiteles in SAA pri posameznem bolniku in v posameznih skupinah bolnikov, smo narisali graf hkratne prisotnosti SAA in anti-SAA protiteles (slika 14). Opazimo lahko, da visoke nivoje SAA spremljajo bodisi visoki ali nizki nivoji anti-SAA protiteles in da pri nobeni skupini ni pravila, v kakšnem odnosu bodo nivoji SAA in anti-SAA protiteles. Očitno je torej, da je v nastajanje, izločanje in razgradnjo teh protiteles vključenih več mehanizmov (ne samo nastajanje in razgradnja antigena). Da bi ugotovili, ali je vseeno prisotna kakršnakoli (pozitivna, obratna) korelacija med nivoji anti-SAA protiteles in SAA, smo določili tudi Spearman-ov korelacijski koeficient za vse podatke in znotraj posameznih skupin bolnikov (preglednica XII). Na podlagi teh koeficientov lahko zaključimo, da nismo ugotovili nobene korelacije med nivoji SAA in anti-SAA protiteles, kar se sklada z rezultati, dobljenimi v do sedaj opravljenih presečnih študijah [12, 26]. Verjetno bi boljši vpogled v morebitno povezavo med nivoji SAA in anti-SAA protiteles dobili s spremljanjem teh nivojev skozi daljšo časovno obdobje (longitudinalna študija).

Preglednica XII: Spearmanov korelacijski koeficient (r_s) med vrednostmi SAA in anti-SAA protiteles.

SKUPINA	r_s (SAA↔anti-SAA)
BAKTERIJSKA OKUŽBA (n=30)	-0,209
VIRUSNA OKUŽBA (n=20)	0,416 (p=0,068)
SRČNO-ŽILNE BOLEZNI (n=26)	-0,128
RAK (n=18)	0,054
REVMATOIDNI ARTRITIS (n=12)	0,116
KRVODAJALCI (n=219)	0,014
VSI (n=325)	0,067



Slika 14: Vrednosti SAA in anti-SAA protiteles pri bolnikih v posameznih skupinah; z belo črto so označene referenčne vrednosti, ki smo jih določili pri krvodajalcih.

Kljub temu, da naj bi bile razlike v količini posameznih NAb pri zdravih ljudeh majhne, je bila variabilnost vrednosti za anti-SAA protitelesa v naši skupini krvodajalcev večja kot pa npr. variabilnost vrednosti za SAA v tej skupini; razvidno tudi iz velikosti okvirja na grafičnem prikazu skupine krvodajalcev (sliki 12 in 13). Zato bi morda tudi odklon od fiziološkega stanja bolj zanesljivo prepoznali s spremljanjem (ne)stabilnosti nivojev anti-SAA protiteles pri vsakem posamezniku kot pa s primerjavo vrednosti, določene v eni časovni točki, z referenčno vrednostjo, določeno pri krvodajalcih. Stalno povišani nivoji teh protiteles pri zdravih krvodajalcih bi lahko nakazovali na skrbno uravnano imunsko homeostazo [12,15].

5.2 LONGITUDINALNO SPREMLJANJE RAVNI SAA IN PROTITELES PROTI SAA

Longitudinalno smo spremljali bolnike z zgodnjim neopredeljenim artritismom. Pogoja za vključitev v prospektivno študijo sta bila oligoartritis (prizadetost najmanj 3 sklepov) ter dalj kot 3 mesece trajajoča bolečina v sklepih.

5.2.1 Primerjava vrednosti SAA in anti-SAA protiteles pred pričetkom zdravljenja

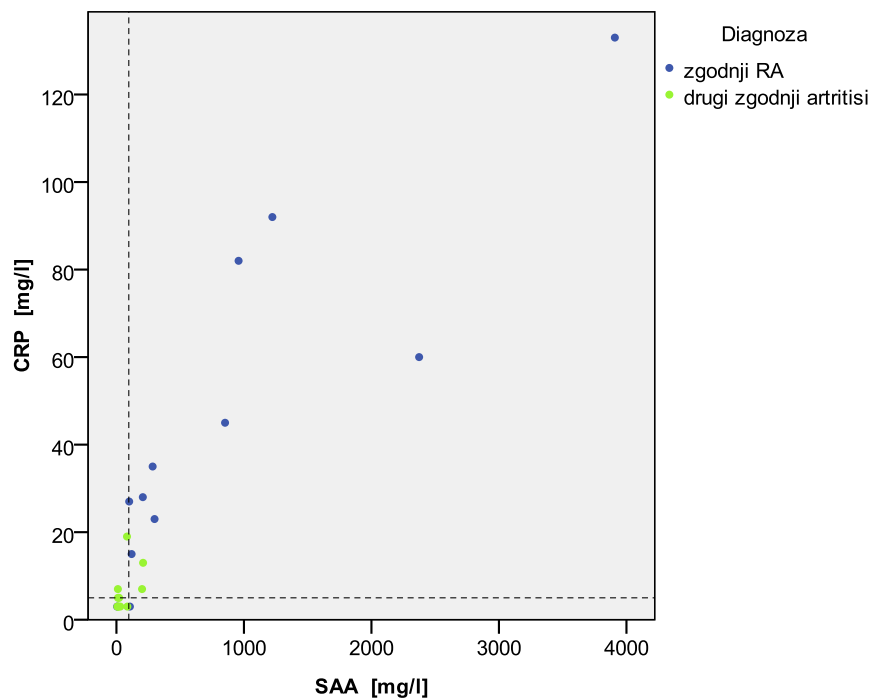
Za 23 bolnikov smo imeli vzorec, odvzet pred pričetkom zdravljenja (časovna točka 0). Primerjali smo 2 skupini bolnikov: bolnike, ki jim je bila kasneje postavljena diagnoza zgodnjega revmatoidnega artritisa in bolnike z drugimi oblikami zgodnjega artritisa. Visoki začetni nivoji SAA naj bi se pojavljali izključno pri bolnikih z zgodnjim revmatoidnim artritismom, zaradi česar naj bi SAA, za razliko od C-reaktivnega proteina (CRP) in hitrosti sedimentacije eritrocitov (ESR), omogočal tudi razlikovanje med zgodnjim revmatoidnim in drugimi oblikami artritisa [16]. Zato smo najprej primerjali vrednosti teh vnetnih kazalcev v obeh skupinah (podatki o CRP in hitrosti sedimentacije eritrocitov so pridobljeni iz rutinskih preiskav) (preglednica XIII).

Preglednica XIII: Vrednosti vnetnih kazalcev v dveh skupinah bolnikov pred pričetkom zdravljenja.

VNETNI KAZALEC		ZGODNJI RA (n=12)	DRUGI ZGODNJI ARTRITISI (n=11)		
SAA	mediana [mg/l]	292	21		
	najmanjša vrednost [mg/l]	6	8		
	največja vrednost [mg/l]	3909	209		
	primeri nad 97 µg/ml	11/12 (91,6%)	2/11 (18,2%)		
CRP	največja vrednost [mg/l]	133	19		
	primeri ≥ 5 µg/ml	10/12 (83,3%)	4/11 (36,4%)		
ESR	mediana [mm/h]	40	16		
	najmanjša vrednost [mm/h]	15	3		
	največja vrednost [mm/h]	76	63		
	moški <50 let: nad 15 mm/h	0/1	1/2		
	moški > 50 let: nad 20 mm/h	2/2	8/12 (66,6%)	0/1	4/11 (36,4%)
	ženske < 50 let: nad 20 mm/h	0/0		2/5	
ženske > 50 let: nad 28 mm/h	6/9		1/3		

Naši rezultati so bili precej podobni rezultatom študije, ki so jo opravili Cunnane in sodelavci [16]. Ugotovili smo namreč, da je bila za SAA določena mediana res višja v skupini bolnikov, ki so kasneje razvili revmatoidni artritis, kot pri bolnikih z drugimi oblikami artritisa. Prav tako smo opazili, da začetne vrednosti SAA pri ostalih oblikah

zgodnjega artritisa niso nikoli presegle 209 mg/l, so pa pri skoraj polovici bolnikov z zgodnjim RA presegle celo 850 mg/l (prikazana samo najvišja vrednost). Začetna vrednost SAA bi zato morda lahko bila dodaten kriterij, na podlagi katerega bi bilo mogoče v že zelo zgodnji stopnji vnetnega artritisa napovedati verjetnost za razvoj RA. To bi pripomoglo h kvalitetnejši obravnavi bolnikov, saj je zgodnji vnetni artritis kritično obdobje, v katerem lahko z ustrezno izbiro zdravljenja dosežemo popolno remisijo bolezni [45,46]. Glede na naše rezultate, bi na osnovi povišane vrednosti SAA prepoznali skoraj 92% bolnikov, ki bodo razvili revmatoidni artritis oz. se bo bolezen pojavila pri skoraj 85% bolnikov (11 od 13) s povišanimi začetnimi nivoji SAA. Ob povišanih vrednostih SAA smo pogosto določili tudi povišane vrednosti CRP (slika 15), a bi samo na osnovi povišanega CRP prepoznali manj bolnikov (približno 83 %), ki bodo razvili RA, še manj pa, če bi o tem sklepali le na podlagi hitrosti sedimentacije eritrocitov (67%). S slike 15 je razvidno tudi, da je absolutno zvišanje koncentracij SAA večje kot pri CRP (merilo na oseh grafa), kar pomeni, da omogoča večjo občutljivost merjenja.



Slika 15: Hkratne vrednosti SAA in CRP pri posameznem bolniku. ---prazne vrednosti za CRP in SAA.

Presenetljivo je sicer, da smo pri dveh bolnikih ugotovili povišan CRP (slika 15), ne pa tudi povišanih nivojev SAA. Pri enem od teh dveh smo ugotovili tudi povečano hitrost sedimentacije eritrocitov (ni prikazano). Zanimivo pa je, da nobeden od njiju ni razvil RA. Očitno hkratno zvišane vrednosti SAA bolj verjetno nakazujejo, da se bo bolezen razvila v

RA, kot pa če sta CRP in ESR zvišana v odsotnosti povišanega SAA. To pomeni, da so vrednosti SAA verjetno res primernejše za razlikovanje med obravnavanima skupinama kot pa CRP in hitrost sedimentacije eritrocitov.

Nadalje nas je zanimala tudi prisotnost določenih protiteles v obeh skupinah bolnikov (preglednica XIV). Revmatoidni faktor (RF) in protitelesa proti citruliniranim peptidom (anti-CCP) se določajo v okviru specialističnih preiskav in so v pomoč pri postavitvi diagnoze pri bolnikih z zgodnjim neopredeljenim artritismom. Medtem ko je revmatoidni faktor pogosto prisoten tudi pri drugih avtoimunskih boleznih (ne samo pri revmatoidnem artritisu), so za anti-CCP protitelesa ugotovili, da so precej specifična za RA; približno 93% bolnikov z zgodnjim neopredeljenim artritismom, ki imajo potrjeno prisotnost teh protiteles, naj bi razvilo revmatoidni artritis [47].

Preglednica XIV: Prisotnost avtoprotiteles v dveh skupinah bolnikov. Anti-CCP- proti citruliniranim peptidom, RF-revmatoidni faktor. *podatki samo za 4 od 12 bolnikov.

PROTITELESA		ZGODNJI RA (n=12)	DRUGI ZGODNJI ARTRITISI (n=11)
anti-SAA	mediana [a.e]	89	103
	primeri nad 560 a.e.	2/12 (16,7%)	1/11 (9,1%)
	primeri pod 8 a.e.	0/12	0/12
	primeri znotraj fiziol.mej	10/12 (83,3%)	10/11 (90,9%)
anti-CCP	prisotna v št.primero	5/12 (41,7%)	0/12
RF	prisotna v št.primero	8/12 (66,6%)	0/4 *

Iz zgornje preglednice je razvidno, da je prisotnost anti-CCP protiteles sicer zelo specifičen kazalec bolezni (pri nobenem bolniku iz druge skupine teh protiteles niso potrdili), a očitno razmeroma slabo občutljiv. V našem primeru bi na podlagi teh protiteles prepoznali le 42% bolnikov, ki bodo razvili RA, na osnovi revmatoidnega faktorja sicer nekoliko več, a vemo, da ni zelo specifičen. Tako se tudi tukaj kaže prednost in dodatna vrednost določanja povišanih koncentracij SAA. Ob sočasnem določanju le-teh bi namreč lahko prepoznali več bolnikov z zgodnjim RA, kot pa je to mogoče na osnovi do sedaj uporabljenih in uveljavljenih kazalcev. Res pa je, da bi tudi pri SAA, podobno kot pri ostalih vnetnih kazalcih, morali upoštevati še druge možne razloge za povišane vrednosti (soboleznost, infekcije, poškodbe). Če smo za skupino bolnikov z zgodnjim revmatoidnim artritismom že omenili, da pri njih nismo opazili pod fiziološko mejo znižanih nivojev anti-SAA protiteles, je zanimivo, da velja enako tudi za skupino z drugimi

oblikami artritisa (preglednica XIV). Nad fiziološko mejo zvišani nivoji se v tej skupini pojavljajo redkeje kot pri bolnikih z zgodnjim RA. Opazili smo tudi, da imajo bolniki, pri katerih so anti-SAA protitelesa prisotna nad fiziološkimi mejami, razmeroma nizke vrednosti SAA, v primerjavi z ostalimi bolniki v skupini – tako pri zgodnjem revmatoidnem kot pri drugih zgodnjih artritidih (podatki prikazani le za bolnike z zgodnjim RA). Če naj bi šele dolgotrajno povišane koncentracije SAA izzvale tudi povečano nastajanje anti-SAA protiteles, bi torej prej pričakovali, da bodo tudi vrednosti SAA v omenjenih primerih povišane. Pri tem je morda potrebno upoštevati, da so anti-SAA protitelesa pretežno IgG razreda [12], ki ima razpolovno dobo 7-21 dni (odvisno od podrazreda) [48], medtem ko je razpolovna doba SAA manj kot 1 dan [49]. Povišane koncentracije SAA bi zato dosegle normalne nivoje prej kot anti-SAA protitelesa, po drugi strani pa bi lahko povišani nivoji anti-SAA protiteles v teh primerih nakazovali tudi na uspešnost odstranjevanja antigena. Vsekakor bi bilo potrebno bolj natančno preučiti lastnosti anti-SAA protiteles (podrazred, razpolovni čas) pri zdravih posameznikih in pri bolnikih, saj je pri slednjih izgradnja in razgradnja mnogih proteinov spremenjena. Prav tako bi lahko dobili več odgovorov s spremljanjem nivojev anti-SAA protiteles skozi daljše obdobje.

5.2.2 Ravni SAA in anti-SAA protiteles pri bolnikih z zgodnjim RA

Glede na določene začetne vrednosti SAA lahko bolnike z zgodnjim revmatoidnim artritidom razdelimo v 3 podskupine (preglednica XV). Bolnike smo razdelili glede na to, ali je bila pri njih začetna vrednost SAA pod določeno referenčno vrednostjo, ali zmerno oz. zelo povišana. Glede na to, da pri nobenem od bolnikov nismo določili vrednosti SAA med 400 in 800 mg/l, smo vrednost 400 mg/l upoštevali kot zgornjo mejo srednjega in vrednost 800 mg/l kot spodnjo mejo prvega razreda.

Preglednica XV: Značilnosti posameznih podskupin bolnikov z zgodnjim RA. RF+:prisotni revmatoidni faktor, anti-CCP +:prisotna anti-CCP protitelesa, DAS-lestvica za ocenjevanje aktivnosti bolezni (Disease Activity Score).

VREDNOSTI SAA	ŠT. BOLNIKOV	MOŠKI	ŽENSKE	POVPR. DAS	RF+	anti-CCP+
> 800 mg/l	5/12 (41,7%)	1/5 (20%)	4/5 (80%)	6,03 *	4/5 (80,0%)	3/5 (60,0%)
97 - 400 mg/l	6/12 (50,0%)	2/6 (33%)	4/6 (67%)	5,35**	4/6 (66,6%)	2/6 (33,3%)
< 97 mg/l	1/12 (8,3%)	0/1	1/1	np	0/1	0/1

* na osnovi 2 dostopnih podatkov

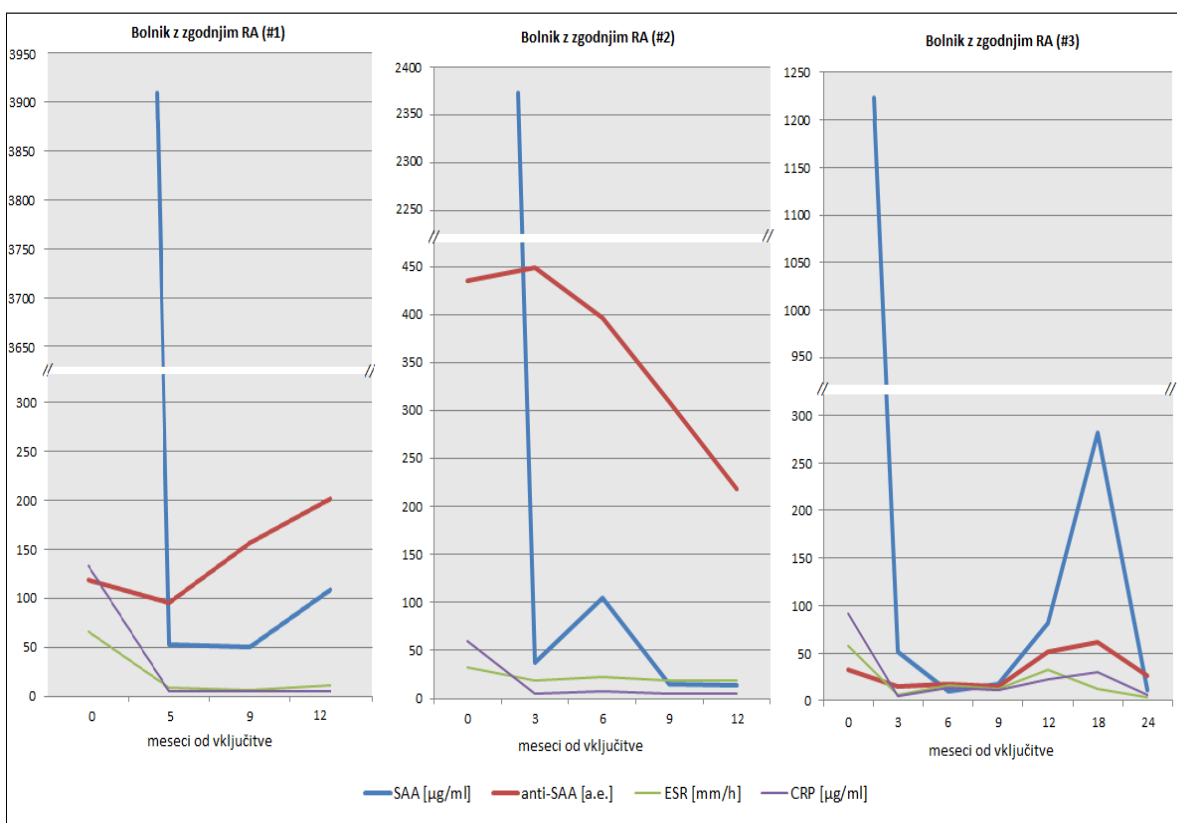
** na osnovi 3 dostopnih podatkov

Iz podatkov v preglednici je razvidno, da je imela približno polovica bolnikov z zgodnjim revmatoidnim artritisom zelo visoke vrednosti SAA (več kot 40-krat višje od središčne vrednosti določene v zdravi populaciji), polovica je bila takšnih, ki so imeli vrednosti SAA zmerno povišane. Zanimivo je, da so imeli bolniki z visokimi vrednostmi SAA pogosteje tudi prisotna anti-CCP protitelesa in revmatoidni faktor. Prav tako smo opazili, da je bila povprečna vrednost DAS (ocena aktivnosti bolezni) ob prvem obisku višja pri bolnikih z visokimi kot pri tistih z zmerno povišanim vrednostmi SAA. To nam že daje slutiti, da bi lahko bile vrednosti SAA povezane z aktivnostjo bolezni. Znano je, da se revmatoidni artritis pogosteje pojavlja pri ženskah, pri čemer se bolezen običajno prične v srednjih letih (pred menopavzo). Skladno s tem je bilo tudi v naši skupini 3-krat več žensk kot moških, vendar je bila njihova povprečna starost 62 let. Je pa res, da so bile ženske z visokimi vrednostmi SAA v povprečju mlajše (54 let) od tistih z zmerno povišanimi vrednostmi SAA (povprečna starost 70 let). Močno povišane vrednosti SAA so se tako v glavnem pojavljale pri ženskah, pri katerih je že zaradi zgodnjega nastopa bolezni, prisotnosti RF (4/4) in anti-CCP protiteles (3/4) večja verjetnost za težji potek bolezni. Visoke vrednosti SAA ob nastopu bolezni bi zato morda lahko predstavljale nov, neodvisen napovedni dejavnik za težji potek revmatoidnega artritisa.

A) Ravni SAA in anti-SAA protiteles pri bolnikih z visokimi začetnimi vrednostmi SAA

Iz časovnega poteka nivojev SAA, anti-SAA protiteles, CRP in ESR pri 3 bolnikih iz prve skupine vidimo, da so se visoke začetne vrednosti SAA do drugega obiska pri zdravniku pri vseh treh bolnikih močno znižale (slika 15). Padejo pod prazno vrednost določeno pri krvodajalcih (97 mg/l), kar je najverjetneje posledica uvedene terapije (nesteroidna protivnetna zdravila in protirevmatična zdravila, ki vplivajo na imunsko odzivnost). Sočasno s SAA se znižajo tudi vrednosti ostalih dveh vnetnih kazalcev, a je območje znotraj katerega nihata CRP in ESR precej manjše kot velikostni razred spremembe pri SAA. Čeprav krivulje, ki ponazarjajo potek nivojev SAA, CRP in ESR izkazujejo podoben trend (naraščanje, padanje), so torej spremembe v vrednostih CRP in ESR manjše in zato težje prepoznavne. SAA je očitno res občutljivejši vnetni kazalec. Zanimivo bi bilo vedeti, ali lahko opažene poraste vrednosti SAA pripišemo poslabšanju oz. napredovanju bolezni, ali če so bila morda ob takratnem odvzemu krvi prisotna tudi kakšna druga vnetna stanja. Nivoji anti-SAA protiteles pri teh bolnikih ostajajo vedno znotraj postavljenih fizioloških mej, a nihajo; ponekod se zdi, da sledijo naraščajočim in padajočim vrednostim antigena,

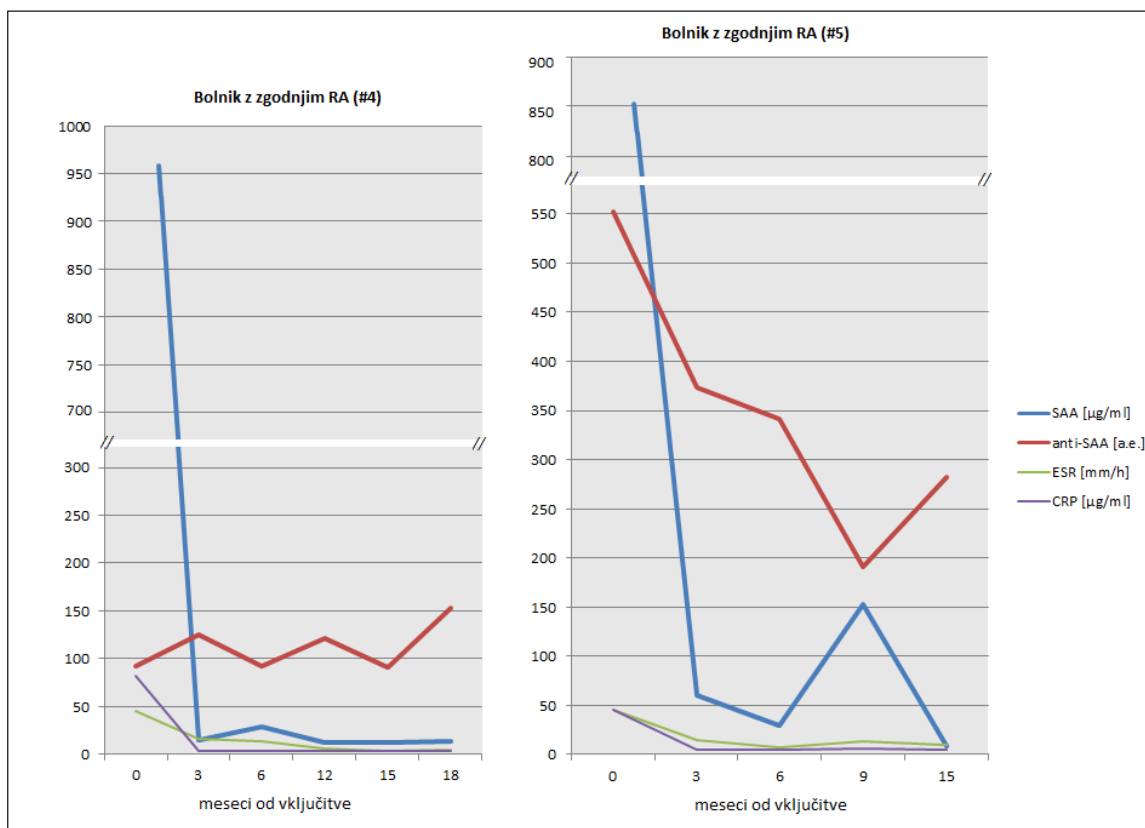
kar bi lahko nakazovalo na povečano sintezo protiteles, izzvano s porastom koncentracij antigena in na sodelovanje protiteles pri odstranjevanju SAA. V kolikor res sodelujejo pri odstranjevanju antigena, bi se anti-SAA protitelesa kljub povečanem nastajanju tudi hitreje porabljala, kar pomeni, da bi lahko sčasoma opazili obrat v ravneh SAA in anti-SAA protiteles. Vseeno na osnovi teh podatkov nismo uspeli potrditi nobene korelacije med nivoji SAA in anti-SAA protiteles.



Slika 15: Časovna odvisnost (šteto v mesecih od vključitve v študijo) nivojev SAA, anti-SAA protiteles, CRP in ESR pri 3 bolnikih z visokimi začetnimi vrednostmi SAA.

Pri dveh bolnikih iz te skupine smo opazili zanimivejše trende krivulj, ki prikazujejo potek anti-SAA protiteles (slika 16). Nivoji anti-SAA protiteles sicer ostajajo v referenčnem območju, a nihajo in na več odsekih izkazujejo nasproten trend kot krivulje, ki prikazujejo potek nivojev SAA. Še posebej je to opazno pri bolniku #5, saj istočasno nastopita 'lokalni minimum' krivulje za anti-SAA protitelesa in 'lokalni maksimum' krivulje, ki ponazarja potek SAA. Na žalost pri tem bolniku nismo imeli podatkov o vrednostih DAS (Disease Activity Score), bi pa bilo vsekakor zanimivo primerjati te laboratorijsko določene parametre s klinično sliko (aktivnost bolezni, število otečenih, bolečih sklepov) ob tem času. Podobno kot pri zgornjih treh bolnikih smo tudi pri teh dveh ugotovili, da vrednosti SAA dobro korelirajo s CRP in ESR (koeficient korelacije $>0,95$ pri $p=0,01$), ne pa tudi z

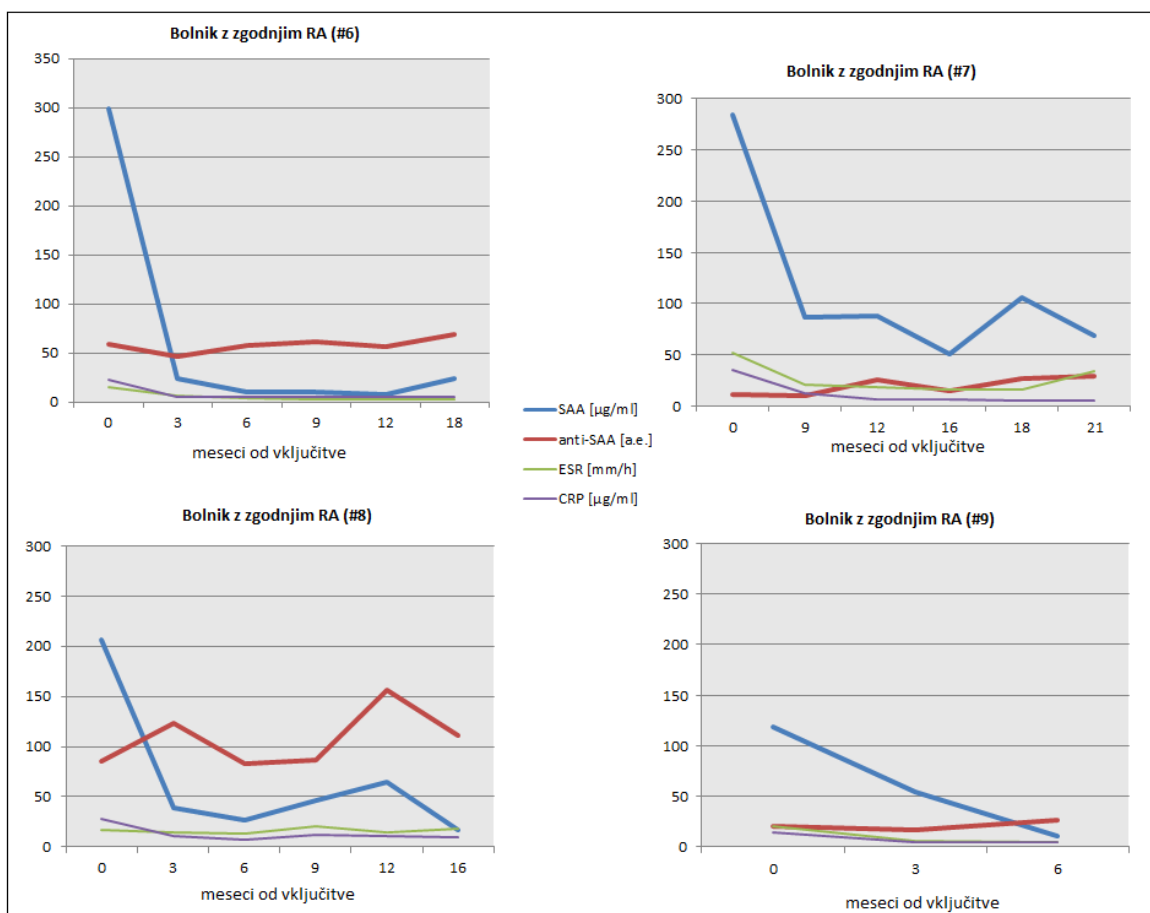
anti-SAA protitelesi; obratne korelacije med anti-SAA protitelesi in SAA nismo potrdili niti za zadnje tri točke pri bolniku #5.



Slika 16: Časovna odvisnost (šteto v mesecih od vključitve v študijo) nivojev SAA, anti-SAA protiteles, CRP in ESR pri 2 bolnikih z visokimi začetnimi vrednostmi SAA.

B) Ravni SAA in anti-SAA protiteles pri bolnikih z začetnimi vrednostmi SAA < 400 mg/l

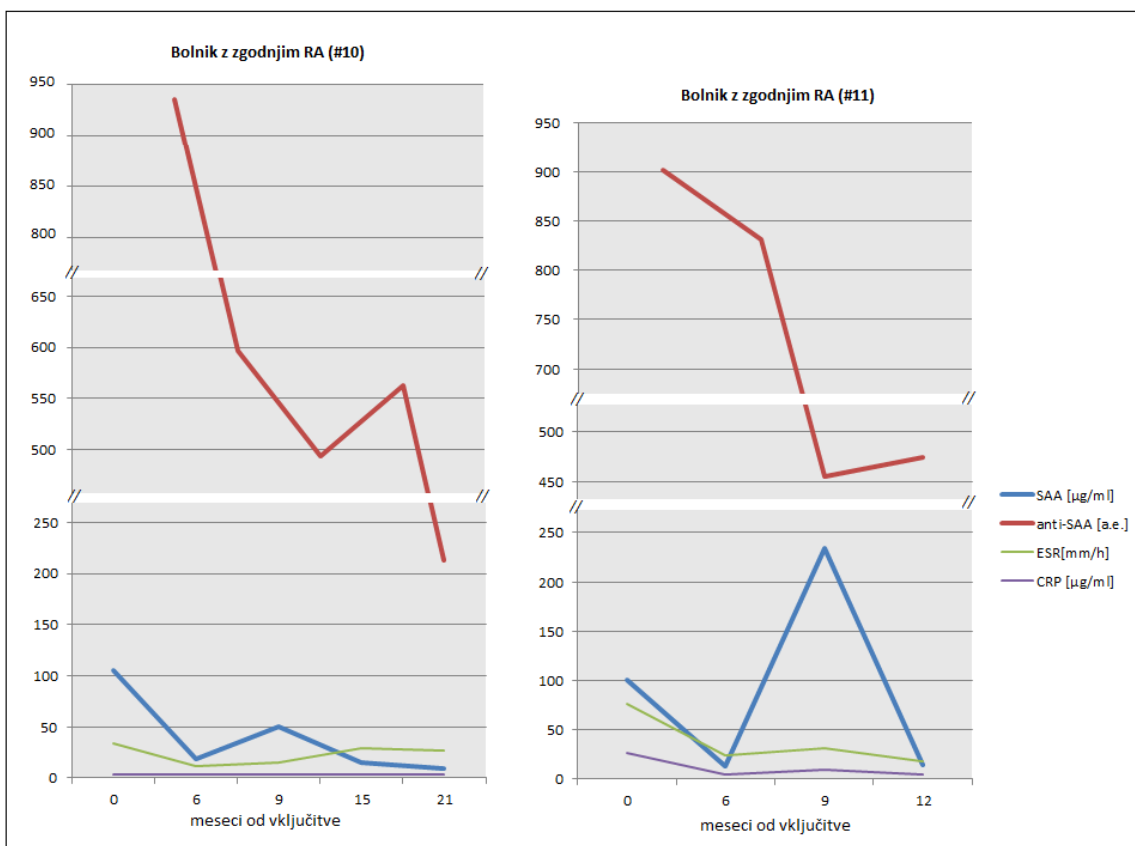
Pri prvih štirih bolnikih iz te skupine (slika 17) se vrednosti SAA po uvedbi protivnetne terapije znižajo in večinoma tudi ohranijo pod prazno vrednostjo. Zanimivo je, da so nivoji anti-SAA protiteles v tej skupini na splošno nižji (središčna vrednost 72 a.e.) kot v skupini bolnikov z visokimi vrednostmi SAA (mediana za anti-SAA protitelesa 119 a.e.), kar se sklada z že omenjeno predpostavko, da je nastajanje in izločanje anti-SAA protiteles lahko pogojeno s količino prisotnega antigena. Pri 3 od spodnjih 4 bolnikov so nivoji anti-SAA protiteles nižji od mediane, določene pri krvodajalcih (88 a.e.) in se v glavnem zelo malo spreminjajo s časom. Vedno nizke nivoje anti-SAA protiteles bi mogoče lahko povezali z zmanjšanim odstranjevanjem antigena, kar bi npr. pripomoglo k pogostejšim nihanjem koncentracije SAA (bolnik #7) oz. ponovnemu vračanju vrednosti SAA nad postavljeno referenčno.



Slika 17: Časovna odvisnost (šteto v mesecih od vključitve v študijo) nivojev SAA, anti-SAA protiteles, CRP in ESR pri 4 bolnikih s srednje visokimi začetnimi vrednostmi SAA.

Kljub temu, da je bila mediana, določena za anti-SAA protitelesa, v tej skupini nižja kot pri zdravih krvodajalcih, smo pri dveh bolnikih iz skupine potrdili nad fiziološko mejo povišane nivoje anti-SAA protiteles (slika 18). Po prvem obisku se nivoji protiteles znižajo sočasno z antigenom in postopoma preidejo v fiziološko območje in zdi se, da nadaljnje upadanje vrednosti anti-SAA protiteles dovoljuje ponovni porast SAA (morda zato, ker manjša količina anti-SAA protiteles omogoča odstranjevanje le majhnih količin antigena). Ker 'lokalnemu maksimumu' krivulje, ki ponazarja nihanje koncentracij SAA, sledi naslednji 'lokalni maksimum' krivulje, ki ponazarja potek nivojev anti-SAA protiteles, bi lahko bil prvi povod za drugega. Ali povedano drugače: ponovno povišanje vrednosti SAA bi lahko vodilo v naslednje povišanje nivojev anti-SAA protiteles. Tako bi lahko razložili obraten trend omenjenih krivulj na posameznih odsekih, če bi ocenjevali le odnos med anti-SAA protitelesi in antigenom. Vendar moramo upoštevati tudi učinke protivnetne terapije in možnost napredovanja bolezni. Za bolnika #11 imamo npr. podatek, da je imel ob prvem obisku bolečih 14 in otečenih 12 sklepov, po 6 mesecih pa 1 bolečega

in 2 otečena. Ravno zato bi bilo zanimivo vedeti, kakšna je bila njegova klinična slika po 9 mesecih.



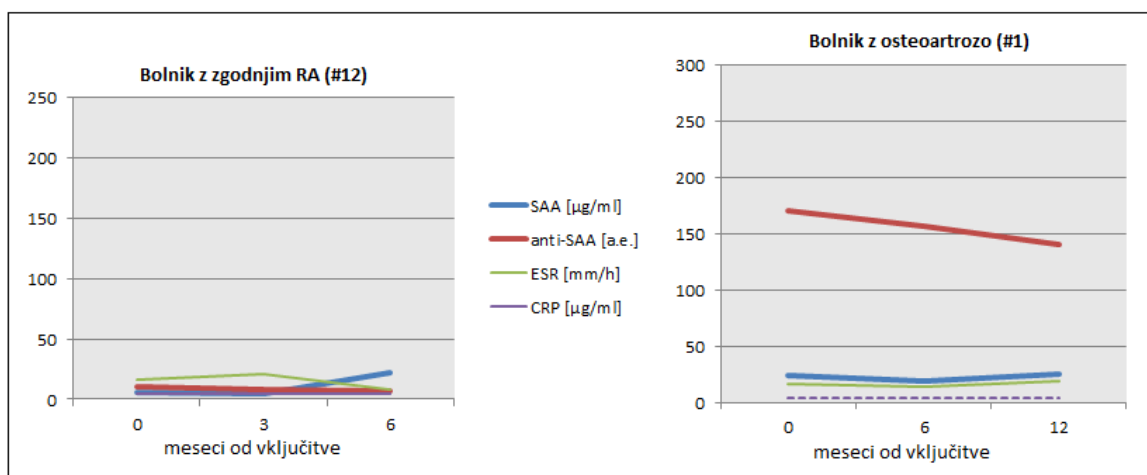
Slika 18: Časovna odvisnost (šteto v mesecih od vključitve v študijo) nivojev SAA, anti-SAA protiteles, CRP in ESR pri 2 bolnikih s srednje visokimi začetnimi vrednostmi SAA.

Presenetilo nas je, da smo v tej skupini redkeje potrdili povezavo SAA z vrednostmi CRP ter ESR. SAA je koreliral s CRP in ESR pri 3 od 6 bolnikov. Najverjetneje zato, ker se CRP v koncentracijah pod 5 mg/l v rutinskih preiskavah ne določa, kar pomeni, da nam je bil na voljo le podatek, da je koncentracija CRP nižja od te meje.

C) Ravni SAA in anti-SAA protiteles pri bolniku z začetno vrednostjo SAA < 97 mg/l

Med bolniki z zgodnjim revmatoidnim artritisom smo le pri enem od njih ugotovili zelo nizke začetne vrednosti SAA (slika 19). Nenavadno je, da so vrednosti SAA nizke, čeprav je imela bolnica ob prvem obisku prizadetih (otečenih) več kot 10 sklepov. Ker so Cunnane in sodelavci [16] ugotovili, da SAA dobro korelira s potekom oz. aktivnostjo bolezni, bi pričakovali, da korelira tudi s številom prizadetih sklepov. Pri izračunu vrednosti DAS se namreč med drugim upošteva tudi število otečenih in bolečih sklepov. Glede na to, da lahko SAA lokalno (v sklepu) inducira encime kot so matriksne metaloproteinaze, ki pripomorejo k razgradnji sklepnega hrustanca in za katere so že

dokazali, da so povezane z aktivnostjo bolezni [50], bi bilo povezavo med SAA in številom prizadetih sklepov mogoče razložiti tudi na molekularnem nivoju. Ker nismo razpolagali z dovolj podatki, nismo uspeli ugotoviti, ali so imeli bolniki z zelo visokimi začetnimi vrednostmi SAA prizadetih res več sklepov kot npr. bolniki z zmerno povišanimi nivoji SAA. Verjetno so vrednosti SAA med posamezniki preveč različne oz. odvisne od preveč dejavnikov, da bi bilo mogoče že na osnovi koncentracije SAA oceniti obseg bolezni in število okvarjenih sklepov pri različnih bolnikih. Ni pa izključeno, da ta ocena ni možna na podlagi spremljanja sprememb v koncentracijah SAA pri posameznem bolniku. Zanimivo bi bilo vedeti, zakaj so bile začetne vrednosti SAA pri tej bolnici nizke. V tem primeru so bili nivoji SAA in drugih določenih laboratorijskih parametrov namreč bolj podobni tistim pri kontrolni skupini kot pa pri ostalih bolnikih z zgodnjim revmatoidnim artritisom (slika 19). Kontrolno skupino (n=3) so nam predstavljali bolniki z osteoartrito, ki je nevtetno obolenje/obraba sklepov. Pri bolniku #12 smo opazili tudi najnižje nivoje anti-SAA protiteles v skupini bolnikov z revmatoidnim artritisom.



Slika 19: Časovna odvisnost (šteto v mesecih od vključitve v študijo) nivojev SAA, anti-SAA protiteles, CRP in ESR pri bolniku z zgodnjim RA in pri bolniku z osteoartrito.

Nadalje bi zato predlagali, da se vrednosti SAA določajo in sproti primerjajo z oceno aktivnosti bolezni ter številom otečenih in bolečih sklepov ob vsakem obisku bolnika pri zdravniku oz. rednem odvzemu krvi. Prav tako bi bilo dobro upoštevati morebitne pridružene vnetne bolezni in zdravila predpisana v zdravljenju le- teh. Potrebno bi bilo spremljati tudi spremembe v terapiji osnovne bolezni (odmerki, zamenjava zdravila). Tako bi lažje razumeli morebitna nihanja v koncentracijah SAA in tudi bolj upravičili uporabo SAA kot kazalca za hitro zaznavanje sprememb poteka bolezni.

5.2.3 Določanje korelacije med SAA in aktivnostjo boleznj zgodnjega RA

Aktivnosti revmatoidnega artritisa ni moč oceniti le na podlagi enega laboratorijskega parametra, zato se za oceno aktivnosti boleznj uporablja lestvica DAS 28 (28 ker upošteva 28 sklepov). Pri izračunu vrednosti DAS se upoštevajo: število bolečih sklepov (BS), število otečenih sklepov (OS), bolnikova ocena aktivnosti boleznj (ocena počutja) ter hitrost sedimentacije eritrocitov (ESR). H končnemu rezultatu na DAS lestvici naj bi največ doprinesla ESR [51]. Ker se uporablja za izračun te ocene, bi pričakovali, da bo ESR, v primerjavi z drugimi vnetnimi kazalci, bolje korelirala z vrednostjo DAS. Ravno zato je zanimivo, da so Cunnane in sodelavci ugotovili [16], da je pri bolnikih z zgodnjim artritism SAA tisti, ki najbolj korelira s kazalci aktivnosti boleznj (DAS, OS, BS).

Najprej smo iskali povezavo med vnetnimi kazalci in kazalci aktivnosti boleznj v celotni skupini bolnikov z zgodnjim neopredeljenim artritism, potem posebej za moške in ženske, ter posebej za skupino z zgodnjim revmatoidnim in za skupino z ostalimi oblikami zgodnjega artritisa (preglednica XVI9). Pri tem smo upoštevali podatke v vseh časovnih točkah (npr. 5 podatkov o hkratnih vrednosti vnetnega kazalca in kazalca aktivnosti boleznj pri enem bolniku, 3 podatke o teh vrednosti pri drugem...).

Preglednica XVI: Spearmanovi korelacijski koeficienti (r_s) za pare spremenljivk. VAS-Visual Analogue Scale (bolnikova ocena aktivnosti svoje boleznj). S krepkim tiskom je označen tisti vnetni kazalec, ki najbolj korelira s kazalci aktivnosti boleznj.

	rS	DAS	VAS	BS	OS
vsí (n = 30)	SAA	0,477 "	/	0,434 "	0,482 "
	ESR	0,843 "	0,330 "	0,409 "	0,570 "
	CRP	0,409 "	0,377 "	0,437 "	0,484 "
moški (n = 6)	SAA	0,609 '	/	0,809 "	0,926 "
	ESR	0,852 "	/	0,766 "	0,830 "
	CRP	0,680 '	0,492 '	0,772 "	0,699 '
ženske (n = 24)	SAA	0,403 "	/	/	/
	ESR	0,823 "	0,371 "	0,339 "	0,482 "
	CRP	0,398 "	0,342 "	0,337 "	0,388 '
zgodnji RA (n = 17)	SAA	0,564 "	/	0,440 "	0,475 "
	ESR	0,831 "	0,382 "	0,434 "	0,570 "
	CRP	0,564 "	0,391 "	0,414 "	0,466 "
drugi zgodnji artritisi (n = 13)	SAA	/	/	/	/
	ESR	0,869 "	/	/	/
	CRP	/	/	/	/

" p<0,01

' p<0,05

Iz podatkov v preglednici je razvidno, da je bil ESR tisti vnetni kazalec, ki je najbolj koreliral z DAS oceno. Ker je vključen v izračun te ocene, je to razumljivo. Zanimivo je, kako dobro SAA korelira s številom otečenih in bolečih sklepov pri moških, medtem ko pri ženskah te povezave ni opaziti; res je sicer, da je bilo v skupini približno 3-krat manj moških kot žensk, koeficient določen na osnovi manjšega števila podatkov pa je manj zanesljiv. Pri bolnikih z zgodnjim revmatoidnim artritisom SAA v primerjavi z ESR bolje korelira s številom bolečih, a slabše s številom otečenih sklepov. V zadnji skupini smo potrdili le povezavo med ESR in DAS. Lahko da zato, ker je bila skupina v primerjavi s skupino bolnikov z zgodnjim revmatoidnim artritisom bolj raznolika (bolniki z reaktivnim, psoriatičnim, neopredeljenim artritisom) in razlike med posamezniki večje, so pa bile tudi koncentracije CRP v tej skupini najpogosteje pod referenčno vrednostjo. Ravno zaradi razlik med posameznimi bolniki (interindividualne variabilnosti) je težje iskati povezavo med zgornjimi spremenljivkami v skupini. Verjetno je zato tudi večina korelacijskih koeficientov šibka. Večjo težo bi imela ugotovitev, kako korelirajo vnetni kazalci in kazalci aktivnosti bolezni pri posameznem bolniku skozi daljše obdobje in pri kolikšnem deležu bolnikov v skupini je korelacija močna/šibka. Za enkrat smo imeli le pri redkih bolnikih podatke o DAS vrednosti ter številu bolečih in otečenih sklepov v vsaki oz. v več kot 2 časovnih točkah. V preglednici XVII so zbrani 'korelacijski koeficienti' med spremenljivkami, določenimi pri bolnikih, pri katerih smo te podatke imeli, in sicer v 4 ali 5 časovnih točkah. Pri CRP je bilo pogosto težje potrditi kakršnokoli povezavo z aktivnostjo bolezni predvsem zato, ker smo imeli v več časovnih točkah podatek, da je nižji od 5 mg/l (torej ga statistični program obravnava kot konstanto in ne spremenljivko).

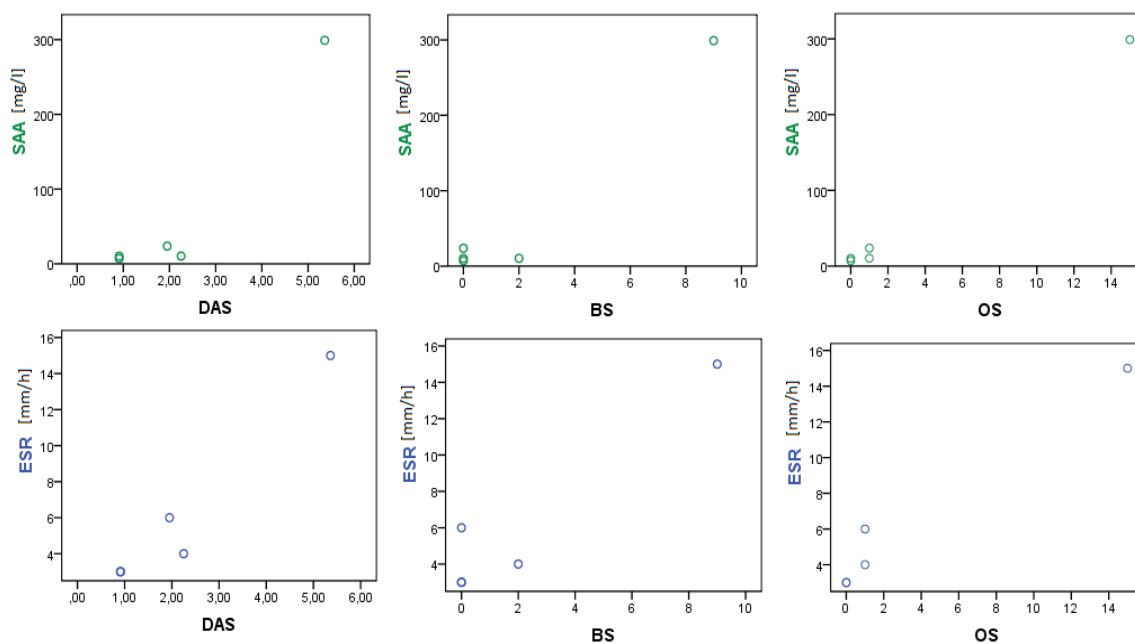
Preglednica XVII: Spearmanovi korelacijski koeficienti (r_s) za pare spremenljivk. VAS-Visual Analogue Scale (bolnikova ocena aktivnosti svoje bolezni). S krepkim tiskom je označen tisti vnetni kazalec, ki najbolj korelira s kazalci aktivnosti bolezni.

	rS	DAS	VAS	BS	OS
bolnik #6	SAA	0,872 '	0,975 "	/	0,949 "
	ESR	0,895 '	1,00 "	/	0,973 "
	CRP	/	/	/	/
bolnik #13	SAA	1,00 "	0,949 '	/	/
	ESR	0,900 '	/	0,894 '	/
	CRP	1,00 "	0,975 "	0,894 '	0,900 '
bolnik #14	SAA	1,00 "	/	/	/
	ESR	0,900 '	/	/	0,899 '
	CRP	/	/	/	/

" p<0,01

' p<0,05

Glede na koeficiente bi sicer lahko rekli, da je moč povezave med vnetnimi kazalci in kazalci aktivnosti bolezni večja, kadar obravnavamo vsakega bolnika posebej. Vendar vemo, da je pri tako majhnem številu podatkov oz. urejenih parov (vnetni kazalec, kazalec aktivnosti bolezni) zelo težko govoriti o korelacijah. Četudi so pri bolniku vnetni parametri višji pri npr. višji vrednosti DAS, OS in BS, se zaradi uvedene terapije in znižanja vnetnih kazalcev pogosto zgodi, da je glavnina točk v spodnjem delu grafa in ena skrajna točka v zgornjem delu (slika 20). Zato bi lahko že zaradi tega dobili večjo moč povezave med spremenljivkami.



Slika 20: Odnos med kazalcema vnetja in kazalci aktivnosti bolezni pri bolniku #6. Vsak krogec predstavlja urejen par (laboratorijsko določen vnetni kazalec, kazalec bolezni) ob posameznem obisku (odvzemu krvi). DAS-ocena aktivnosti bolezni, BS in OS- število bolečih in otečenih sklepov.

Ker prospektivna študija še poteka, verjamemo, da bomo v prihodnje pridobili več podatkov, na osnovi katerih bo možno bolje oceniti, kateri izmed teh vnetnih kazalcev najboljše korelira z aktivnostjo bolezni. Na podlagi dosedanjih rezultatov tega še ni moč storiti. Da bi dobili boljši vpogled v odnos med obravnavanimi spremenljivkami, bi predlagali, da se ob vsakem poslabšanju bolezni, ko se določata CRP in ESR, določa hkrati tudi SAA, ne glede na to, ali je že minilo tri mesece od zadnjega odvzema dodatnega vzorca krvi za prospektivno študijo. Ker je SAA bolj odziven oz. občutljiv (absolutno zvišanje koncentracij je večje) in ker se CRP v rutinskih preiskavah ne določa pod koncentracijo 5 mg/l, lahko za enkrat potrdimo le prednost SAA pred CRP.

5.3 MOŽNE FIZIOLOŠKE FUNKCIJE PROTITELES PROTI SAA

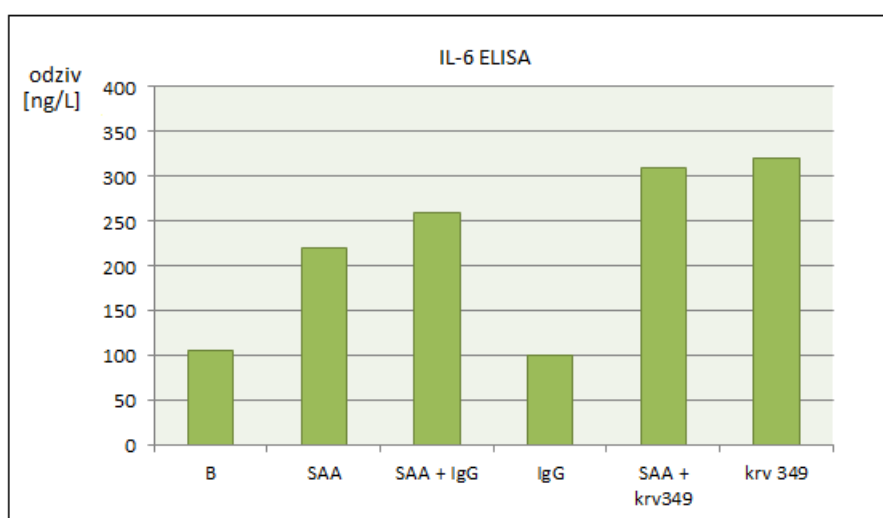
Ugotovljena prisotnost anti-SAA protiteles pri večini zdravih krvodajalcev sproža ugibanja o njihovi vlogi v organizmu. Anti-SAA protitelesa bi lahko imela zaščitno vlogo, z vezavo SAA bi lahko preprečila tudi vnetne učinke, ki jih ta posreduje preko celičnih receptorjev, prav tako pa je možno, da sodelujejo pri odstranjevanju antigena iz organizma in na ta način pripomorejo k razrešitvi akutno faznega stanja [12]. Preverjali smo tudi zamisel o encimski, natančneje hidrolitični, funkciji protiteles. Znano je namreč, da lahko trajno povišane koncentracije A-SAA vodijo v sekundarno amiloidozo, pa tudi hidrolitično sposobnost so nekaterim protitelesom že pripisali.

5.3.1 Ugotovitve pri poskusih na celicah

V predhodnih poskusih se je izkazalo, da lahko z mišjim monoklonskim protitelesom proti SAA (SAA (115)) znižamo s SAA izzvano nastajanje in izločanje vnetnih in adhezijskim molekul iz celic. Podobno bi lahko veljalo tudi za človeška anti-SAA protitelesa. Ker so že pokazali, da anti-SAA protitelesa vežejo SAA v raztopini [12], bi lahko torej preprečila tudi njegovo vezavo na celične receptorje in s tem učinke, ki jih SAA preko njih posreduje. Znano je, da se SAA veže na več receptorjev (npr. »N-Formyl Peptide Receptor-like 1« , »toll-like receptor 2«), vendar so mesta, odgovorna za vezavo, večinoma nepoznana. Hkrati so protitelesa, ki nastajajo v organizmu poliklonska, kar pomeni, da so tudi anti-SAA protitelesa usmerjena proti različnim epitopom SAA. Četudi bi torej protitelo vezalo antigen, ni nujno, da bi s tem preprečilo njegovo vezavo na membranski receptor, saj je lahko usmerjeno proti mestu, ki za to vezavo ni odgovorno.

Pri zasnovi poskusov na celicah smo tretmaje, ki so vsebovali SAA in IgG pripravili do 2 uri vnaprej (predinkubacija), saj je potreben določen čas, da se vzpostavi stanje dinamičnega ravnotežja (kompleksi antigen-protitelo neprestano nastajajo in disociirajo). Poleg tega so uporabljene IgG frakcije vsebovale protitelesa z različno specifičnostjo (le določen delež je bil usmerjen proti SAA). V prvem poskusu nismo uspeli potrditi, da bi lahko z IgG frakcijo, ki je imela visok odziv na anti-SAA protitelesa, izničili/zmanjšali s SAA izzvano sproščanje IL-6 iz HCAEC (slika 21). Bilo bi sicer možno, da je vseeno prišlo do vezave antigena in tudi do preprečitve vezave na določen celični receptor, le da IL-6 nastaja npr. v večji meri preko drugih signalnih poti, ki jih sproži aktivacija drugega receptorja. Aktivacija enega receptorja namreč vodi v nastajanje več efektorskih molekul in ni dobro znano, kakšen delež posameznega citokina ali adhezijske molekule nastaja po

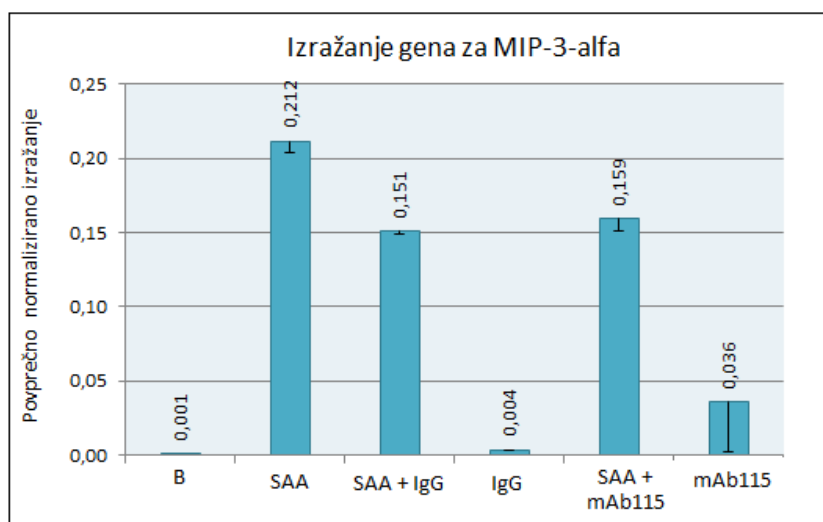
vezavi SAA na določen receptor na površini HCAEC. Zato smo v zbranih supernatantih preverili tudi prisotnost drugih vnetnih in adhezijskih molekul: IL-8, žilne celične adhezijske molekule-1, monocitnega kemotaktičnega proteina-1. Vendar tudi pri teh testih nismo opazili, da bi bil odziv supernatanta nad celicami, tretiranimi s SAA v kombinaciji z IgG frakcijo z znanim anti-SAA odzivom (IgG frakcija je bila izolirana iz seruma zdravega krvodajalca), kaj manjši od odziva, ki ga je dajal supernatant celic, stimuliranih s SAA (podatki niso prikazani). Predvidevamo, da je vzrok za to že nepričakovano nizek (več kot 10-krat nižji kot v dosedanjih poskusih opravljenih na HCAEC) odziv izmerjen v supernatantu celic, stimuliranih s SAA. Zato bi bila za nadaljnje sklepanje najprej potrebna ponovitev poskusa.



Slika 21: Koncentracija IL-6 v supernatantih celic, ki smo jih izpostavili različnim tretmajem. B-ozadje, krv-serum izbranega krvodajalca, IgG-frakcija IgG z znanim anti-SAA odzivom, izolirana iz seruma zdravega krvodajalca.

Lakota in sodelavci so pokazali [40], da lahko s SAA spodbudimo nastajanje in izločanje vnetnih in adhezijskih molekul iz HCAEC, pri čemer pa so bile spremembe, ki so jih opazili na proteinskem nivoju, manj izrazite kot spremembe, opazne v izražanju pripadajočih genov. Zato smo enega od poskusov zasnovali tudi tako, da smo preverjali količino molekul mRNA za tarčne gene v posameznem celičnem lizatu. V tem primeru so bile celice izpostavljene pripravljenim tretmajem 4 ure; čas inkubacije smo skrajšali, ker so spremembe na mRNA nivoju opazne prej kot na proteinskem nivoju in se po 24 urah odziv običajno že umiri (stimulacija upade). Na podlagi določenega povprečnega in na referenčni gen normaliziranega izražanje gena za makrofagni vnetni protein-3-alfa (slika 22), bi lahko rekli, da se je izražanje tega gena v celicah, tretiranih s SAA in IgG, le malo zmanjšalo v primerjavi z izražanjem v celicah, stimuliranih s SAA. Tudi v izražanju genov za IL-8 in

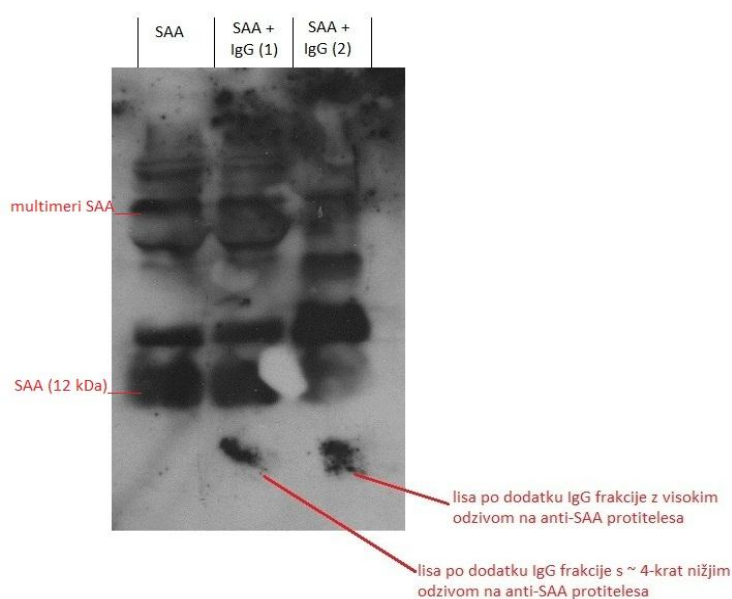
IL-6 nismo uspeli pokazati bistvenih razlik med tema vzorcema (podatki niso prikazani). Ker že s pozitivno kontrolo (mišje monoklonsko protitelo SAA(115)) nismo dosegli pričakovane spremembe v izražanju genov (glede na predhodne poskuse), bi predlagali ponovitev poskusa. Dobro bi bilo izvesti tudi časovni poskus oz. spremljati izražanje tarčnih genov po različnih časih stimulacije celic (4,8, 12, 24 ur). Nadalje se moramo zavedati, da so bili vsi poskusi narejeni z IgG frakcijo in ne s samimi anti-SAA protitelesi. Čeprav smo poznali odziv te frakcije na anti-SAA ELISI (arbitrarne enote), nismo vedeli, kolikšen delež IgG je usmerjen proti SAA. Prebitok IgG frakcije je bil sicer tolikšen, da bi zadostoval za vezavo antigena, če bi anti-SAA protitelesa predstavljala vsaj 5% vseh IgG. Z izolacijo anti-SAA protiteles bi se izognili narejenim predpostavkam in pridobili zanesljivejše rezultate. Ker pa postopka za izolacijo anti-SAA protiteles še nismo razvili in optimizirali, bi lahko za začetek poskus ponovili z različnimi IgG frakcijami, izoliranimi iz serumov več krvodajalcev in bolnikov. Povsem možno je, da se lastnosti anti-SAA protiteles pri posameznikih nekoliko razlikujejo. Prevladujejo lahko npr. protitelesa proti eni ali drugi antigenski determinanti, možno pa je tudi da se specifičnost teh protiteles spremeni ob vnetnem stanju (bolezni). Da bi ugotovili, ali lahko anti-SAA protitelesa resnično preprečijo/zmanjšajo učinke SAA na HCAEC, bodo torej potrebne še nadaljnje raziskave.



Slika 22: Razmerje med izražanjem gena za makrofagni vnetni protein-3-alfa (MIP-3-alfa) in gena za β -aktin v vsakem od vzorcev. B-ozadje, mAb115-mišje monoklonsko protitelo SAA (115), IgG-frakcija IgG z znanim anti-SAA odzivom, izolirana iz seruma zdravega krvodajalca.

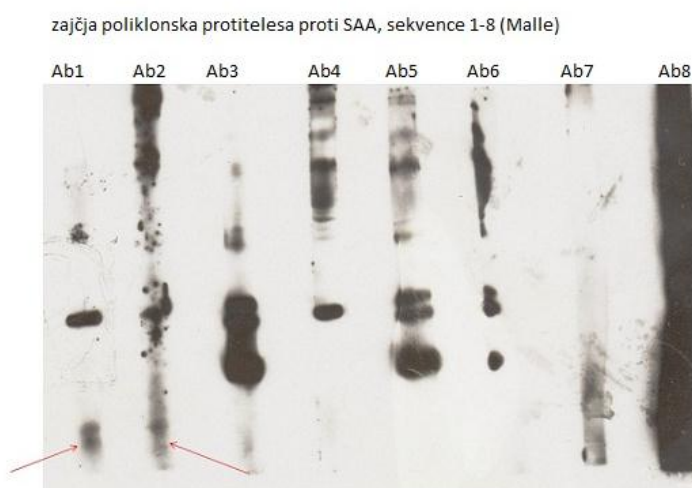
5.3.2 Ugotovitve pri poliakrilamidni gelski elektroforezi ob sočasni inkubaciji SAA in IgG

Hidrolizo SAA lahko katalizirajo številne serumske in celične proteaze (elastaze, kolagenaze, serumske serinske proteaze, nekateri katepsini) [2]. S proteolitično cepitvijo SAA nastajajo netopni fragmenti –fibrile amiloida A, ki so glavna sestavina amiloidnih depozitov. Ker se sekundarna amiloidoza pojavlja kot zaplet kroničnih vnetnih bolezni, torej ob stalno povišanih koncentracijah SAA, nas je zanimalo, kakšno vlogo bi lahko ob tem imela anti-SAA protitelesa. Čeprav je katalitična aktivnost protiteles pogosto manjša kot pri običajnih encimih, so nekaterim protitelesom, ki so npr. prisotna pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi, že pripisali hidrolitično sposobnost – pri bolnikih z RA in SLE so recimo potrdili prisotnost IgG, ki katalizirajo hidrolizo DNA [53]. Ker se je izkazalo, da so anti-SAA protitelesa visoko avidna (kar za NAbS ni zelo značilno) [12], smo ugibali, ali bi lahko bila tudi sama odgovorna za hidrolizo SAA. SAA smo zato pri temperaturi 37°C čez noč inkubirali z IgG frakcijo protiteles z znanim odzivom na anti-SAA protitelesa, vzorce analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo, izvedli Western prenos in imunodetekcijo. Natančna sestava vzorcev je podana v poglavju *Eksperimentalno delo*. IgG frakcije so bile izolirane z afinitetno kromatografijo in tudi sterilno filtrirane, zato je verjetnost prisotnosti drugih snovi minimalna. Poleg tega smo imunodetekcijo izvedli s poliklonskimi kunčjimi protitelesi, specifičnimi za človeški SAA (sekvence 1-8; najprej z vsemi osmimi naenkrat). Pri vzorcih, kjer smo SAA dodali IgG frakcijo, smo na NC membrani opazili dodatno liso, nižjo od tiste, ki je pripadala SAA (slika 23).



Slika 23: Rezultat imunodetekcije s poliklonskimi kunčjimi protitelesi proti človeškemu SAA (film, ki smo ga položili preko nitrocelulozne membrane).

Velikost opaženih lis je bila različna, kar je tudi skladno z različno količino anti-SAA protiteles v posameznih IgG frakcijah. Naslednjič smo po analizi zmesi SAA in IgG (2) imunodetekcijo izvedli tako, da smo vsak nitrocelulozni trak inkubirali z drugim primarnim protitelesom (poliklonska kunčja protitelesa proti sekvencam 1-8). Tudi v tem primeru smo na NC membrani opazili lise, nižje od SAA (slika 24). Na podlagi teh rezultatov bi predlagali nadaljnje poskuse za potrditev dosedanjih opažanj. Poleg samega SAA in zmesi SAA z IgG bi bilo potrebno na gel nanesti še vsaj sama protitelesa, dobro bi bilo nanesti tudi kakšno negativno kontrolo: npr. za preveritev specifičnosti cepitve proteina, bi lahko nanесли goveji serumski albumin (sam in skupaj z IgG), nadalje pa tudi zmes SAA in IgG brez predhodne inkubacije čez noč. Ker sta bili uporabljeni IgG frakciji izolirani iz serumov zdravih krvodajalcev, bi v prihodnje lahko preverili tudi kakšne rezultate bodo dajale Ig frakcije izolirane iz serumov bolnikov z različnimi vnetnimi boleznimi.



Slika 24: Rezultat imunodetekcije s poliklonskimi kunčjimi protitelesi, ki prepoznajo različne sekvence SAA (film, ki smo ga položili preko nitroceluloznih trakcev).

Zavedati se moramo, da je dokaz intrinzične katalitične sposobnosti naravnih protiteles zahtevna naloga. Da lahko nekemu protitelesu pripišemo encimsko aktivnost, mora biti izpolnjenih več kriterijev. Ne samo, da moramo imeti izolirano specifično protitelo, potrebno je tudi dokazati, da se ob izolaciji nanj ni vezal kak drug protein (encim); zato se mora npr. katalitična sposobnost protitelesa ohraniti tudi po gelski filtraciji pod ekstremnimi pogoji (nizek, visok pH, nevtralni pufri z gvanidinijevim tiocianatom), ki zagotavljajo, da morebiti nastali kompleksi disociirajo. Nadalje je dobro potrditi substratno

specifičnost in katalitično sposobnost samih Fab fragmentov [52]. Zgornji rezultati zato še niso dokaz za hidrolitično sposobnost anti-SAA protiteles, so pa izhodišče za nadaljnje raziskave. Predvsem zato, ker nakazujejo možnost, da je katalitična sposobnost teh protiteles intrinzična in da je lahko značilna tudi za protitelesa, izolirana iz seruma zdravih ljudi. Do sedaj so pri zdravih ljudeh potrdili le encimsko sposobnost IgA v mleku doječih mater in zato predvidevajo, da se katalitična protitelesa pojavljajo le v posebnih razmerah oz. stanjih telesa; npr. pri avtoimunskih boleznih, pa tudi med nosečnostjo. Res pa je, da niti za abcime pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi ni povsem jasno, ali je encimska sposobnost njihova funkcija ali 'disfunkcija' [53]. Zato bo v prihodnje zanimivo ugotoviti, kakšna je vloga anti-SAA protiteles v organizmu, predvsem če res posedujejo tudi encimsko sposobnost.

6. SKLEP

V presečni študiji smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Ravni anti-SAA protiteles so pri zdravih krvodajalcih in pri večini bolnikov z vnetnimi boleznimi podobne; značilna odstopanja smo opazili le pri srčno-žilnih bolnikih.
- Anti-SAA protitelesa so bila prisotna nad postavljeno fiziološko mejo le v skupinah bolnikov s kroničnimi vnetnimi boleznimi (avtoimunska bolezen, rak, srčno-žilno obolenje), zato je možno, da šele dolgotrajno povišane vrednosti SAA privedejo do sprememb v nivoju anti-SAA protiteles.
- V nobeni od obravnavanih skupin bolnikov nismo ugotovili povezave med nivoji SAA in anti-SAA protiteles.

S spremljanjem bolnikov z zgodnjim revmatoidnim artritismom skozi daljše obdobje smo ugotovili:

- Pri bolnikih z zgodnjim neopredeljenim artritismom, se visoki začetni nivoji SAA pojavljajo izključno pri tistih bolnikih, ki pozneje razvijejo RA; vrednosti SAA, določene pred pričetkom zdravljenja, bi zato lahko bile dodaten kriterij, na podlagi katerega bi bila možna zgodnejša postavitev diagnoze RA.
- Močno povišane začetne vrednosti SAA so se najpogosteje pojavljale pri bolnikih, ki imajo (zaradi prisotnosti revmatoidnega faktorja in/ali protiteles proti citruliniranim peptidom) večjo verjetnost za težji potek revmatoidnega artritisa.
- SAA lahko služi kot kazalec za spremljanje poteka bolezni pri bolnikih z zgodnjim revmatoidnim artritismom; ker je bolj občutljiv kazalec vnetja, ima v tem pogledu prednosti pred CRP.
- Za enkrat še ne moremo oceniti, kateri izmed vnetnih kazalcev (SAA ali ESR) najbolje korelira z aktivnostjo bolezni pri bolnikih z zgodnjim RA.

Poskusi za vrednotenje zamisli o fiziološki funkciji anti-SAA protiteles so pokazali:

- Za nadaljnje raziskave in potrditev dosedanjih rezultatov bo potrebna izolacija anti-SAA protiteles.

7. LITERATURA

- [1] Human SAA, Protocol Booklet, Invitrogen, ZDA, 2010; 4-8
- [2] C.M. Uhlar, A.S. Whitehead: Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999; 265 : 501-523.
- [3] N. Upragarin, W.J. Landman, W. Gaastra, E. Gruys: Extrahepatic production of acute phase serum amyloid A. *Histol Histopathol* 2005; 20: 1295-1307.
- [4] R. O'Hara, E.P. Murphy, A.S. Whitehead, O. FitzGerald, B. Bresnihan: Acute-phase serum amyloid A production by rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Res* 2000; 2: 142-144.
- [5] Lakota K., Resnik N., Mrak-Poljsak K., Sodin-Semrl S., Veranic P.: Colocalization of Serum Amyloid A with Microtubules in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *J Biomed Biotech* 2011, 8 strani, ID# 528276 (članek v tisku).
- [6] J.D. Gillmore, L.B. Lovat, M.R. Persey, M.B. Pepys, P.N. Hawkins: Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet* 2001; 358: 24-29.
- [7] S. Sodin-Semrl, P. Zigon, S. Cucnik, T. Kveder, A. Blinc, M. Tomsic, B. Rozman: Serum amyloid A in autoimmune thrombosis. *Autoimmun Rev* 2006; 6: 21-27.
- [8] L.E. Jensen, A.S. Whitehead: Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochem J* 1998; 334: 489-503.
- [9] V.L. King, J. Thompson, L.R. Tannock: Serum amyloid A in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2011; 22: 302-307.
- [10] E. Malle, S. Sodin-Semrl, A. Kovacevic: Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 9-26.
- [11] C. Gabay, I. Kushner: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340: 448-454.
- [12] K. Lakota, G.G. Thallinger, S. Cucnik, B. Bozic, K. Mrak-Poljsak, A. Ambrozic, B. Rozman, A. Blinc, M. Tomsic, S. Sodin-Semrl: Could antibodies against serum amyloid A function as physiological regulators in humans?. *Autoimmunity* 2011; 44: 149-158.
- [13] C. Watterson, A. Lanevski, J. Horner, C. Loudon: A comparative analysis of acute-phase proteins as inflammatory biomarkers in preclinical toxicology studies: implications for preclinical to clinical translation. *Toxicol Pathol* 2009; 37: 28-33.

- [14] H. Miwata, T. Yamada, M. Okada, T. Kudo, H. Kimura, T. Morishima: Serum amyloid A protein in acute viral infections. *Arch Dis Child* 1993; 68: 210-214.
- [15] K. Lakota, P. Zigon, K. Mrak-Poljsak, B. Rozman, Y. Shoenfeld, S. Sodin-Semrl: Antibodies against acute phase proteins and their functions in the pathogenesis of disease: A collective profile of 25 different antibodies. *Autoimmun Rev* 2011; 21.
- [16] G. Cunnane, S. Grehan, S. Geoghegan, C. McCormack, D. Shields, A.S. Whitehead, B. Bresnihan, O. Fitzgerald: Serum amyloid A in the assessment of early inflammatory arthritis. *J Rheumatol* 2000; 27: 58-63.
- [17] A. Chait, C.Y. Han, J.F. Oram, J.W. Heinecke, Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease?. *J Lipid Res* 2005; 46: 389-403.
- [18] T. Katayama, H. Nakashima, C. Takagi, Y. Honda, S. Suzuki, Y. Iwasaki, K. Yano: Prognostic value of serum amyloid A protein in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 2005; 69: 1186-1191.
- [19] Vozelj M: Temelji imunologije, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 275-303, 372-352, 379-404.
- [20] V. Kotnik, V. Čurin Šerbec, K. Hartman Pretnar, A. Ihan, M. Jeras, A.N. Kopitar, T. Malovrh, S. Simčič, S. Stopinšek, M. Skvarč, B. Vidan Jeras, B. Vraber: Imunološki priročnik, 1. izdaja, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana 2010: 37, 147-152, 168-173.
- [21] D. Male, J. Brostoff, D.B. Roth, I. Roitt: *Immunology*, 7. izdaja, Mosby Elsevier, 2006: 365-381.
- [22] A. Poletaev, L. Osipenko: General network of natural autoantibodies as immunological homunculus (Immunculus). *Autoimmun Rev* 2(2003): 264-271.
- [23] H. Amital, Y. Shoenfeld: Natural autoantibodies, heralding, protecting and inducing autoimmunity, v Peter JB, Shoenfeld Y: *Autoantibodies*. Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, 2007; 7-12
- [24] I.R. Cohen: Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. *J Autoimmun* 2007; 29: 246-249.
- [25] A.B. Poletaev, V.L. Stepanyuk, M.E. Gershwin: Integrating immunity: the immunculus and self-reactivity. *J Autoimmun* 2008; 30: 68-73.
- [26] B.J. Rosenau, P.H. Schur: Antibody to serum amyloid A. *J Autoimmun* 2004; 23: 179-182.

- [27] F. Balkwill, A. Mantovani: Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet* 2001; 357: 539-545.
- [28] F. Guadagni, P. Ferroni, R. Palmirotta, I. Portarena, V. Formica, M. Roselli: TNF/VEGF cross-talk in chronic inflammation-related cancer initiation and progression: an early target in anticancer therapeutic strategy. *In Vivo* 2007; 21: 147-161.
- [29] H. Lu, W. Ouyang, C. Huang: Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 221-233.
- [30] G.W. Sullivan, I.J. Sarembock, J. Linden: The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 591-602.
- [31] R. Ross: Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
- [32] Bresjanac M: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, 9. Izdaja, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2005: 236-248.
- [33] F. Ohsuzu, The roles of cytokines, inflammation and immunity in vascular diseases. *J Atheroscler Thromb* 2004; 11: 313-321.
- [34] Lothar Thomas: Clinical Laboratory Diagnosis, Use and Assessment of Clinical Laboratory Results, 1. izdaja, TH-Books, Frankfurt, 1998: 697-699
- [35] http://www.siumed.edu/~bbartholomew/course_material/protein_methods.htm (27.6.2011)
- [36] http://www.biosynth.com/index.asp?topic_id=114&g=19&m=174 (29.6.2011)
- [37] http://www.piercenet.com/Files/1601959_WB%20HB_v3_intl.pdf (27.6.2011)
- [38] <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=5A3F09D2-5056-8A76-4E96-30DFE2E1B731> (27.6.2011)
- [39] Štrukelj B., Kos J.: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1. izdaja, SFD, Ljubljana, 2007; 51-55
- [40] K.Lakota, K. Mrak-Poljšak, B. Rozman, T. Kveder, M. Tomšič, S. Sodin-Semrl: Serum amyloid A activation of inflammatory and adhesion molecules in human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *European Journal of Inflammation* 2007; 5: 73-81.
- [41] W. Hijmans, J.D. Sipe: Levels of the serum amyloid A protein (SAA) in normal persons of different age groups. *Clin Exp Immunol* 1979; 35: 96-100.

- [42] C. Pizzini, M. Mussap, M. Plebani, V. Fanos: C-reactive protein and serum amyloid A protein in neonatal infections. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 229-235.
- [43] T. Nakayama, S. Sonoda, T. Urano, T. Yamada, M. Okada: Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. *Clin Chem* 1993; 39: 293-297.
- [44] H. Biran, N. Friedman, L. Neumann, M. Pras, R. Shainkin-Kestenbaum: Serum amyloid A (SAA) variations in patients with cancer: correlation with disease activity, stage, primary site, and prognosis. *J Clin Pathol* 1986; 39: 794-797.
- [45] A. Finckh: Early inflammatory arthritis versus rheumatoid arthritis, *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21:118-123.
- [46] M.H. Ma, I.C. Scott, G.H. Kingsley, D.L. Scott: Remission in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2010; 37: 1444-1453.
- [47] Immunoscan CCPlus®, Manual, Euro-Diagnostica AB, Malmö, Švedska, 2009; 2-5
- [48] http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/affinity/CALBIOCHEM_HumanIgG_Subclasses.pdf (30.7.2011)
- [49] J.G. Raynes, E.H. Cooper: Comparison of serum amyloid A protein and C-reactive protein concentrations in cancer and non-malignant disease. *J Clin Pathol* 1983; 36: 798-803.
- [50] I. Tchetverikov, L.R. Lard, J. DeGroot, N. Verzijl, J.M. TeKoppele, F.C. Breedveld, T.W. Huizinga, R. Hanemaaijer: Matrix metalloproteinases-3, -8, -9 as markers of disease activity and joint damage progression in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 1094-1099.
- [51] H. Makinen, H. Kautiainen, P. Hannonen, T. Mottonen, M. Korpela, M. Leirisalo-Repo, R. Luukkainen, K. Puolakka, A. Karjalainen, T. Sokka: Disease activity score 28 as an instrument to measure disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2007; 34: 1987-1991.
- [52] http://www.proteinsandproteomics.org/content/free/protocols_2/523-534-PI-Ch29.pdf (10.8.2011)
- [53] G.A. Nevinsky, T.G. Kanyshkova, V.N. Buneva: Natural catalytic antibodies (abzymes) in normalcy and pathology. *Biochemistry (Mosc)* 2000; 65: 1245-1255.