

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Anže ZORIN

**VLOGA AKTIVACIJE KOMPLEMENTNEGA  
SISTEMA PRI DIABETIČNI NEFROPATIJ**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Anže ZORIN

**VLOGA AKTIVACIJE KOMPLEMENTNEGA SISTEMA PRI  
DIABETIČNI NEFROPATJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**ROLE OF COMPLEMENT ACTIVATION IN DIABETIC  
NEPHROPATHY**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Vladimirja Kotnika, dr. med., za recenzenta pa prof. dr. Petra Mačka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter Maček

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Vladimir Kotnik, dr. med.

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

Datum zagovora: 2. 4. 2012

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

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anže Zorin

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD	Dn
DK	616.61:579(043.2)=163.6
KG	MBL/Polimorfizem MBL-2/Lektinska pot aktivacije/Diabetična nefropatija
AV	ZORIN, Anže
SA	KOTNIK, Vladimir (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2012
IN	VLOGA AKTIVACIJE KOMPLEMENTNEGA SISTEMA PRI DIABETIČNI NEFROPATIJI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 57 str., 9 pregl., 8 sl., 2 pril., 35 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Aktivacija komplementnega sistema po klasični in alternativni poti ima pomembno vlogo pri nastanku nefropatij, ki jih povzročijo okužbe ali avtoimunost. Nastanek diabetične nefropatije naj bi bil neodvisen od navedenih načinov in povezan s pretvorbo glukoze v metabolite, ki aktivirajo komplement po lektinski poti. Klinične raziskave so že nakazale vlogo manan-vezavnega lektina (MBL) pri nastanku diabetične nefropatije. Količina MBL je pri posameznikih močno odvisna od genotipa gena MBL-2. V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, kakšen genotip gena MBL-2 imajo sladkorni bolniki z znano nefropatijo. V ta namen smo analizirali tri polimorfizme posameznih nukleotidov (SNP) v eksonu 1, ki vplivajo na količino MBL. Vsi bolniki, ki smo jih preiskali, so spadali v skupino z divjim tipom gena MBL-2 (AA genotip), ta pa je povezan z normalno koncentracijo MBL v krvi. Pri vseh preiskovancih smo izvedli teste za ugotavljanje aktivacije komplementa po klasični in alternativni poti, merili smo koncentracijo sestavin in odlomkov MBL, C3, C3d, C4, C4d in SC5b-9 v plazmi ter C4d in SC5b-9 v urinu. Na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo trditi, da je nastanek diabetične nefropatije povezan s koncentracijo proteina MBL.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dn

DC 616.61:579(043.2)=163.6

CX MBL/MBL-2 Polymorphism/Lectin pathway activation/Diabetic nephropathy

AU ZORIN, Anže

AA KOTNIK, Vladimir

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2012

TI **ROLE OF COMPLEMENT ACTIVATION IN DEVELOPMENT OF DIABETIC NEPHROPATHY**

DT Graduation thesis (University studies)

NO XII, 57 p., 9 tab., 8 fig., 2 ann., 35 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Involvement of classical and alternative pathway of complement activation in development of renal disease caused by infection or autoimmune response is well established. We propose that development of diabetic nephropathy is an independant process in which glucose is transformed into metabolites that activate the lectin pathway of complement activation. Clinical studies have proposed that a mannan binding lectin (MBL) has a role in development of diabetic nephropathy. Studies of MBL-2 genotypes have also established a strong connection between genotype and MBL serum concentrations. In our study we investigated MBL-2 gentye in a group of diabetic patients with established nephropathy. We genotyped three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exon 1 of MBL-2 gene. All patients were positive for wild type gene (AA diplotype) which is also associated with normal serum concentrations of MBL protein. For proper evaluation of complement status we tested all patients for activity of classical and alternative pathway activation. We also tested for concentration and presence of components and fragments of MBL, C3, C4, C4d, C3d and SC5b-9 in plasma, and for the C4d and SC5b-9 presence in urine. According to our data we can not confirm that diabetic nephropathy is connected with normal levels of MBL protein.

**KAZALO VSEBINE**

	<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	III
	<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	IV
	<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	VIII
	<b>KAZALO SLIK</b>	IX
	<b>KAZALO PRILOG</b>	X
	<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	XI
<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>- 1 -</b>
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV</b>	<b>- 2 -</b>
2.1	KOMPLEMENTNI SISTEM	- 2 -
2.2	SESTAVINE KOMPLEMENTNEGA SISTEMA	- 3 -
2.3	POTI AKTIVACIJE KOMPLEMENTNEGA SISTEMA	- 6 -
<b>2.3.1</b>	<b>Klasična pot aktivacije</b>	- 6 -
<b>2.3.2</b>	<b>Alternativna pot aktivacije</b>	- 6 -
<b>2.3.3</b>	<b>Lektinska pot aktivacije</b>	- 7 -
<b>2.3.4</b>	<b>Terminalna pot</b>	- 8 -
2.4	URAVNAVANJE DELOVANJA KOMPLEMENTA	- 9 -
2.5	MBL – LEKTIN, KI VEŽE MANAN	- 10 -
<b>2.5.1</b>	<b>Funkcije MBL</b>	- 12 -
<b>2.5.2</b>	<b>Polimorfizem MBL</b>	- 13 -
2.6	DIABETIČNA NEFROPATIJA	- 15 -
<b>2.6.1</b>	<b>MBL in boleznih ledvic</b>	- 16 -
<b>2.6.2</b>	<b>MBL in diabetična nefropatija</b>	- 17 -
<b>3</b>	<b>CILJ NALOGE</b>	<b>- 20 -</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>- 21 -</b>
4.1	DOLOČANJE AKTIVNOSTI KOMPLEMENTNEGA SISTEMA PO KLASIČNI POTI	- 21 -
<b>4.1.1</b>	<b>Pufri</b>	- 21 -
<b>4.1.2</b>	<b>Pripomočki</b>	- 21 -
<b>4.1.3</b>	<b>Izvedba</b>	- 22 -

4.2	DOLOČANJE AKTIVNOSTI KOMPLEMENTNEGA SISTEMA PO ALTERNATIVNI POTI	- 24 -
4.2.1	<b>Pufri</b>	- 24 -
4.2.2	<b>Pripomočki</b>	- 24 -
4.2.3	<b>Izvedba testa</b>	- 25 -
4.3	DOLOČANJE AKTIVNOSTI KOMPLEMENTNEGA SISTEMA PO LEKTINSKI POTI	- 26 -
4.3.1	<b>Pufri</b>	- 26 -
4.3.2	<b>Ostale raztopine</b>	- 26 -
4.3.3	<b>Pripomočki</b>	- 28 -
4.3.4	<b>Potek testa</b>	- 28 -
4.4	DOLOČANJE KONCENTRACIJE DELCA SC5b-9	- 29 -
4.4.1	<b>Pufri</b>	- 29 -
4.4.2	<b>Protitelesa</b>	- 30 -
4.4.3	<b>Ostale raztopine</b>	- 30 -
4.4.4	<b>Pripomočki</b>	- 31 -
4.4.5	<b>Potek testa</b>	- 31 -
4.5	DOLOČANJE KOLIČINE DELCA C3d/dg KOMPLEMENTNEGA SISTEMA	- 32 -
4.5.1	<b>Pufri</b>	- 32 -
4.5.2	<b>Agar za vgrajevanje protiteles proti C3d (A063) in C3c (A062)</b>	- 32 -
4.5.3	<b>Pripomočki</b>	- 33 -
4.5.4	<b>Potek testa</b>	- 34 -
4.6	DOLOČANJE KONCENTRACIJE DELCA C4d KOMPLEMENTNEGA SISTEMA	- 34 -
4.6.1	<b>Pufri</b>	- 34 -
4.6.2	<b>Ostale raztopine</b>	- 34 -
4.6.3	<b>Pripomočki</b>	- 35 -
4.6.4	<b>Priprava vzorcev</b>	- 35 -
4.6.5	<b>Potek testa</b>	- 35 -
4.7	DOLOČANJE KONCENTRACIJE SESTAVINE C3 in C4 KOMPLEMENTNEGA SISTEMA	- 36 -

<b>4.7.1</b>	<b>Raztopine</b>	- 36 -
<b>4.7.2</b>	<b>Pripomočki</b>	- 36 -
<b>4.7.3</b>	<b>Potek testa</b>	- 36 -
4.8	GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA POSAMEZNIH NUKLEOTIDOV	- 37 -
<b>4.8.1</b>	<b>HRM PCR Master mix</b>	- 37 -
<b>4.8.2</b>	<b>Pripomočki</b>	- 37 -
<b>4.8.3</b>	<b>Potek testa</b>	- 37 -
<b>5</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>- 39 -</b>
5.1	ZNAČILNOSTI KONTROLNE SKUPINE PREISKOVANCEV	- 39 -
5.2	ZNAČILNOSTI BOLNIKOV	- 44 -
5.3	GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA POSAMEZNIH NUKLEOTIDOV	- 46 -
5.4	ANALIZA ASOCIACIJE MED SNP IN PLAZEMSKO KONCENTRACIJO MBL	- 47 -
5.5	ANALIZA ASOCIACIJE MED PLAZEMSKO KONCENTRACIJO MBL IN NEFROPATIJO	- 48 -
<b>6</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>- 50 -</b>
6.1	RAZPRAVA	- 50 -
6.2	SKLEPI	- 53 -
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>- 54 -</b>
	<b>ZAHVALA</b>	<b>- 58 -</b>
	<b>PRILOGA A</b>	<b>- 57 -</b>
	<b>PRILOGA B</b>	<b>- 62 -</b>



**KAZALO PREGLEDNIC**

Pregl. 1: Sestavine komplementnega sistema pri človeku.....	- 3 -
Pregl. 2: Nastavitve programa za HRM PCR.....	- 38 -
Pregl. 3: Pacienti z diabet. nefropatijo. Neobjavljeni rezultati (Kotnik <i>in sod.</i> , 2006). .	- 39 -
Pregl. 4: Rezultati preiskav pri kontrolni skupini zdravih posameznikov.....	- 40 -
Pregl. 5: Statistične vrednosti opravljenih tetstov. ....	- 42 -
Pregl. 6: Vrednosti statistično značilnih razlik med vzorci.....	- 43 -
Pregl. 7: Rezultati preiskav komp. sistema pri bolnikih z diabetično nefropatijo.....	- 45 -
Pregl. 8 : Stat. vrednosti opravljenih preiskav komp. sistema.....	- 46 -
Pregl. 9: Statistične vrednosti MBL (ng/ml) glede na diplotip MBL-2 gena.....	- 47 -

## KAZALO SLIK

Sl. 1: Shematski prikaz treh različnih poti aktivacije komplementnega sistema.....	- 8 -
Sl. 2: Struktura zrele polipeptidne verige MBL .....	- 12 -
Sl. 3: Organizacija gena <i>mbl-2</i> na kromosomu. ....	- 14 -
Sl. 4: Maillard-ova reakcija.. ....	- 18 -
Sl. 5: Struktura frukto-lizina in manoze. ....	- 19 -
Sl. 6: Plazemske koncentracije MBL. ....	- 47 -
Sl. 7: Distrib. konc. MBL v kon. skupini in pri bolnikih z diabet. nefropatijo. ....	- 48 -
Sl. 8: Distrib. konc MBL, razporejeni v tri gruče glede na genotip MBL-2. ....	- 49 -

**KAZALO PRILOG**

PRILOGA A: Histogrami z normalnimi krivuljami za APH, C3, C4d, SC5b-9.....- 57 -

PRILOGA B: Dovoljenje komisije za medicinsko etiko za delo z materialom.....- 62 -

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

< min	koncentracija je nižja od minimalne koncentracije zaznavne s to metodo
> max	koncentracija je višja od maksimalne koncentracije zaznavne s to metodo
A	okrajšava za adenin
AA	diplo tip MBL-2, pri katerem sta prisotna dva alela divjega tipa
AGE	angl. Advanced Glycation Endproducts
AK	Aminokislina
A0	diplo tip MBL-2, pri katerem je prisoten en alel divjega tipa in en mutiran alel
APH50	alternativna pot aktivacije komplementa
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
C	okrajšava za citozin
C1, C2, C3...	oznake za sestavine komplementa v neaktivni obliki
C1-INH	angl. C1-inhibitor (topni kontrolni protein, inhibitor enote C1)
C2a, C2b...	oznake za cepitvene delce sestavin komplementnega sistema
CH50	klasična pot aktivacije komplementa
CHO	angl. Chinese Hampster Ovarys
CR1	angl. Complement Receptor 1 ( receptor za C1 sestavino komplementa)
CRD	angl. Carbohydrate recognition domain ( domena za prepoznavanje ogljikovih hidratov)
Cys	Cistein
DAF	angl. Decay acceleratng factor (faktor, ki pospešuje razpad)
EDTA	angl. Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (etilen diamin tetraocetna kislina)
EGTA	angl. Ethylene Glycol Tetraacetic Acid (etilenglikol tetraocetna kislina)

ELISA	angl. Enzyme Linked Imunosorbant Assay (encimsko imunski test)
G	okrajšava za gvanin
GBM	angl. Glomerular basement membrane ( glomerularna bazalna membrana )
Glu	Glutamin
GN	Glomerulonefritis
GVB	angl. Glucose Veronal Buffer (Glukozni veronalni pufer)
HRM	angl. High Resolution Melting
iC3b	Inaktiviran odlomek C3b
IgA	Imunoglobulin razreda A
IgG	Imunoglobulin razreda G
IgM	Imunoglobulin razreda M
MAC	angl. Membrane attack complex (terminalni litični kompleks)
MAP-19	z MBL povezana serinska proteaza
MASP	angl. MBL-Associated serine protease
MBL	angl. Mannan binding lectin (lektin, ki veže manan)
MODS	angl. Multiple Organ Dysfunction Syndrome
OD	angl. Optical Density
PBS	angl. Phosphate Buffer Saline
RAGE	angl. Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RID	Radialna imunodifuzija
SC5b-9	v plazmi topen inaktiviran terminalni kompleks
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov, angl. Single Nucleotide Polymorphism
SP	Surfaktantni protein
T	okrajšava za timin

## 1 UVOD

Sladkorna bolezen se pogosto zaplete z okvaro ledvic – nefropatijo. Natančen vzrok nastanka bolezni ni znan. Pojavljanje terminalnega kompleksa v urinu kaže na vlogo komplementa pri razvoju diabetične nefropatije. Dejavniki tveganja so predvsem trajanje sladkorne bolezni, neurejena sladkorna bolezen in s tem povezano nihanje glukoze v krvi, sorodnik z sladkorno boleznijo in nefropatijo, visok krvni tlak, okužba urogenitalnega trakta in kajenje.

Nefropatija lahko nastane kot oblika avtoimunske bolezni, ki je povezana z nastankom preobčutljivosti na protitelesa IgG, preobčutljivostna reakcija tipa 3 po Coombsu in Gellu. Pomembno vlogo pri teh nefropatijah ima komplementni sistem. Zaradi depozicije imunskih kompleksov na bazalni membrani pride do aktivacije komplementnega sistema po klasični poti. V primeru sladkornih bolnikov, ki razvijejo nefropatijo, ni avtoimunskih protiteles in ne razvijejo preobčutljivostne reakcije tipa 3. Zato predpostavljamo, da je morda sprožitveni dejavnik glukoza, ki se pretvarja v manozo in senzibilizira ledvične strukture. To lahko povzroči aktivacijo komplementa po lektinski poti. Takšna aktivacija komplementnega sistema vodi v propadanje ledvičnega tkiva in odpoved normalnega delovanja.

Gen *mbl-2* kodira za beljakovino MBL, ki je pomembna za začetek aktivacije komplementa po lektinski poti. Med ljudmi je zastopan v dveh različicah, ki vplivata na količino MBL. V naši raziskavi želimo ugotoviti, katero različico gena imajo sladkorni bolniki z razvito diabetično nefropatijo in kakšna je koncentracija MBL v krvi teh bolnikov. Naša hipoteza je, da imajo sladkorni bolniki z diabetično nefropatijo različico gena *mbl-2*, ki je povezan z normalno ali visoko koncentracijo MBL.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KOMPLEMENTNI SISTEM

Komplementni sistem je filogenetsko stara oblika obrambe pred nevarnostmi iz okolja. Sestavlja ga 34 serumskih beljakovin, ki se zaporedno aktivirajo in končno oblikujejo litični kompleks, ki poškoduje membrano napadle celice in jo smrtno poškoduje (Kotnik, 2010). V kaskadni reakciji aktivacije se sproščajo anafilatoksini, ki so pomembni mediatorji vnetja in delujejo kemotaktično na levkocite. Nekatere druge sestavine pospešujejo fagocitozo v procesu opsonizacije.

Konec 19. stoletja so Buchner, Fodor, Nuttal in drugi odkrili, da sveži serum vsebuje na toploto občutljivo baktericidno učinkovino, ki so jo imenovali *alexin* (grško, brez imena). Jules Bordet je v svojih raziskavah na *Vibrio cholerae* pokazal, da v baktericidnem delovanju seruma sodelujeta dva faktorja. Toplotno stabilni faktor, ki je prisoten samo v imuniziranem serumu (angl, sensitizer) in na toploto občutljiv faktor, za katerega je domneval, da je enak aleksinu Hansa Buchnerja.

Paul Erlich je preučeval hemolizo eritrocitov v imuniziranem serumu in potrdil obstoj dveh faktorjev. Toplotno stabilen faktor je imenoval amboceptor ali imunsko telesce. Toplotno občutljivi faktor, ki sta ga Buchner in Bordet imenovala aleksin, pa je imenoval *komplement*. Erlich je verjel, da ima vsak amboceptor svoj specifičen komplement. Bordet pa je bil prepričan, da obstaja samo en tip. V začetku 20. stoletja je postalo jasno, da se komplement lahko aktivira na dva načina, nespecifično (Bordet) ali s specifičnimi protitelesi (Erlich) (Morgan, 1990).

## 2.2 SESTAVINE KOMPLEMENTNEGA SISTEMA

Pregl. 1: Sestavine komplementnega sistema pri človeku (Povzeto po Morgan, 1990)

	<i>Sestavina</i>	<i>Molekulska masa (kDa)</i>	<i>Koncentracija v plazmi (<math>\mu</math>M)</i>	<i>Vloga</i>
<i>Klasična pot</i>	C1q	460	0,15	Veže IgG; aktivira komplement po klasični poti.
	C1r	83	0,30	Cepi/aktivira C1s.
	C1s	83	0,30	Cepi/aktivira C4 in C2.
	C4	205	3,0	Veže C2 med aktivacijo.
	C2	102	0,20	Cepi/aktivira C3 in C5.
<i>Alternativna pot</i>	faktor B	93	2,0	Cepi/aktivira C3 in C5.
	faktor D	24	0,05	Cepi/aktivira Faktor B.
	properdin	220	0,1	Stabilizira konvertaze aktivacijske poti.

Se nadaljuje



Nadaljevanje: Pregl. 2: Sestavine komplementnega sistema pri človeku (Povzeto po Morgan, 1990)

<i>Lektinska pot</i>	MBL	192 – 582		Veže se na membranske ogljikovodike in aktivira komplement.
	MASP-1	83		Cepi C2, C3, C4.
	MASP-2	83		Cepi C4, C2; ustvari C3 konvertazo.
	MASP-3	80 – 90		
	Map19	19		Regulator vezave MASP-1 na MBL.
<i>Skupna sestavina</i>	C3	185	7,0	Veže/cepi C5 v konvertazi; kemotaksa, opsonizacija.
<i>MAC</i>	C5	190	0,4	Iniciacija MAC, C5a kemotaktičen/anafilaktičen peptid.
	C6	120	0,5	Samozdruževanje s C5, vezavno mesto za C9.
	C7	110	0,5	
	C8	150	0,4	
	C9	69	0,8	Glavna sestavina MAC. Se vriva v membrano in tvori poro.

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Pregl. 3: Sestavine komplementnega sistema pri človeku (Povzeto po Morgan, 1990)

Topni kontrolni proteini	C1-INH	110	1,8	Veže C1r + C1s, disociira C4.
	C4bp	500	0,5	Pospešuje razpad C4b2a, kofaktor za cepitev C4b s faktorjem I.
	faktor H	150	3,0	Pospešuje razpad C3bBb, kofaktor za faktor I, Cepi/inaktivira C4b + C3b.
	faktor I	80	0,4	Cepi C3b.
	S-protein	83	6,0	Veže C5b-7 v tekoči fazi.
	Sp-40,40	70		
Membranski kontrolni proteini	CR1	160 – 250		Pospešuje razpad C3/C5 konvertaz; kofaktor v cepitvi C3b.
	DAF	70		
	MCP	45 – 70		
	HRF/MIP	65		Kontrola sestavljanja/aktivnosti litičnega kompleksa.
	CD59 antigen	20		

## 2.3 POTI AKTIVACIJE KOMPLEMENTNEGA SISTEMA

Efektorske funkcije komplementa nastanejo po treh poteh. Klasična pot aktivacije se začne z vezavo protitelesne molekule IgM ali IgG in specifičnega antigena v imunski kompleks. Alternativna pot se sproži, če se nekaj spontano aktivirane sestavine C3 (C3b) veže na površino mikroba. Lektinska pot se aktivira z vezavo serumskega lektina, ki veže manan (MBL) na manozo-vsebujoče proteine ali na ogljikove hidrate na bakterijah ali virusih.

Začetni dogodki pri vseh treh poteh aktivacije komplementa vključujejo vrsto zaporednih proteolitičnih cepitev, ki dosežejo višek v nastanku encima, imenovanega konvertaza C3, ki cepi sestavino C3. V tej točki se snidejo vse tri poti in razvijejo se efektorske funkcije komplementa.

### 2.3.1 Klasična pot aktivacije

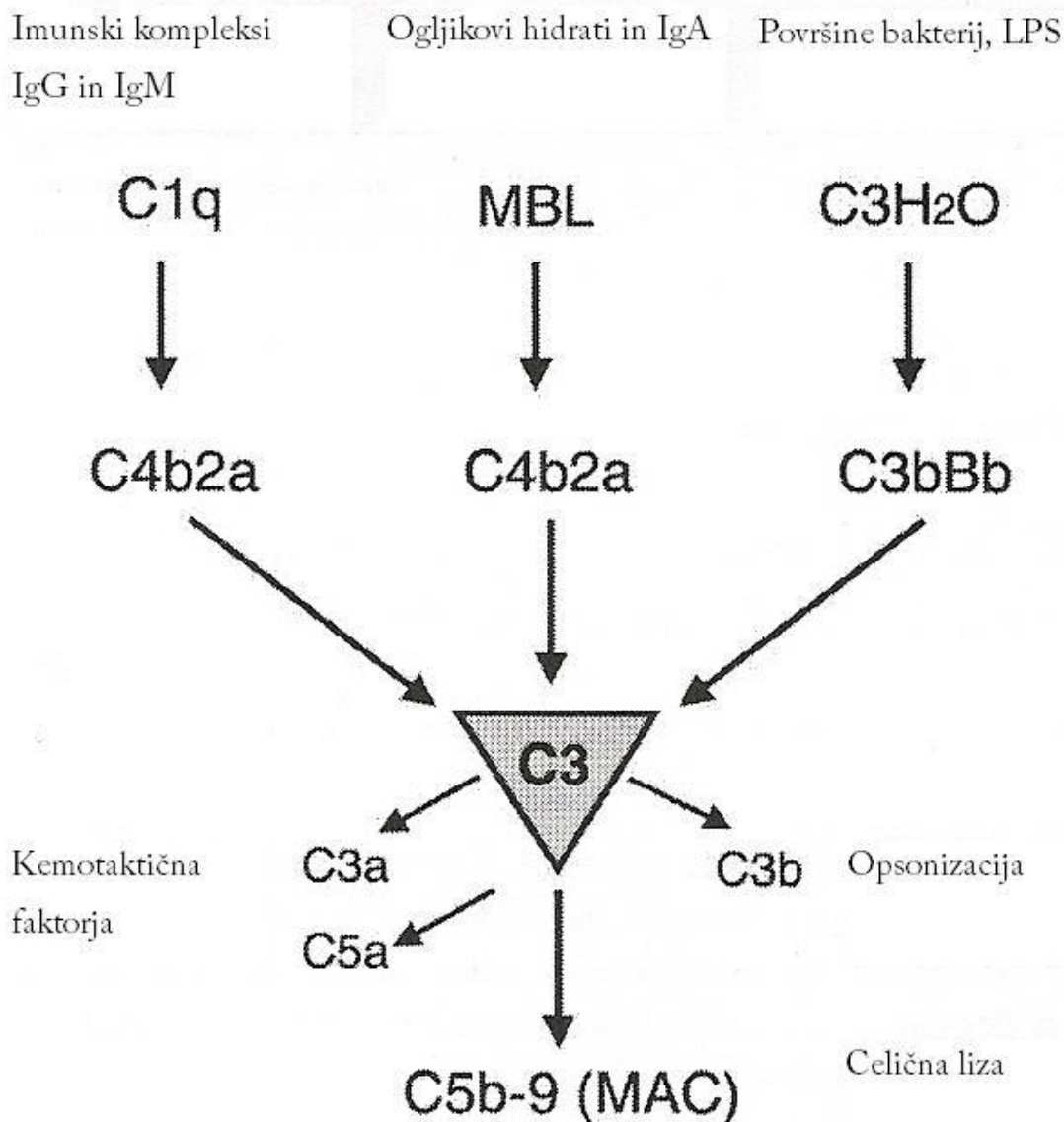
Klasična pot se začne z aktivacijo molekule C1. Ta je multimerni kompleks iz ene enote C1q povezane s dvema podenotama C1r in dvema C1s, ki sta serinski proteinazi. Proteazna aktivnost se izrazi ob vezavi na imunski kompleks, ki vsebuje protitelesa IgM ali IgG. Drugi topni protein, ki se aktivira po klasični poti je C4. Zanj je značilna notranja tioesterska vez, ki jo cepi C1s. Nastane odlomek C4b, ki se kovalentno veže na mikrobnost površino in C4a, ki oddifundira. Tretji topni protein C2 šele z vezavo na C4b postane dostopen za C1s. Zopet nastaneta dva odlomka. C2a je serinska proteinaza in ostane vezana na C4b. Kompleks imenujemo konvertaza C3 po klasični poti. Najpomembnejša aktivnost tega encima je cepitev številnih molekul C3 v C3b in C3a. C3b se veže na mikrobno površino, C3a pa povzroča lokalno vnetje.

### 2.3.2 Alternativna pot aktivacije

Alternativna pot se aktivira s kovalentno vezavo C3b na površino mikroba. V drugi stopnji se na C3b veže faktor B, ki je strukturno in funkcijsko homologen C2. S to vezavo postane faktor B sprejemljiv za cepitev s plazemsko proteazo faktorjem D. Sprosti se majhen odlomek Ba, aktivna proteaza Bb pa ostane vezana v kompleksu. Tako nastane konvertaza C3 po alternativni poti. C3bBb je strukturno in funkcijsko homologna C4b2b – konvertazi C3 po klasični poti.

### **2.3.3 Lektinska pot aktivacije**

Družina proteinov, ki jih poznamo pod imenom z MBL povezane serinske proteaze (MASP), se dokazano povezuje z MBL. V to družino spadajo MASP-1, MASP-2, MASP-3 in Map19. Po do sedaj zbranih podatkih je MASP-2 najpomembnejši pri aktivaciji komplementa po lektinski poti. Kompleksi MBL – MASP-2 se aktivirajo na mikrobnih površinah, ki izražajo na svojih površinah primerne oligosaharidne motive. Aktiven MASP-2 ima enako proteinazno aktivnost kot C1. Najprej cepi C4, zatem pa še C2 vezan na C4b. Nastali kompleks C4b2a ali konvertaza C3, se v ničemer ne razlikuje od enakega kompleksa, ki nastane pri klasični poti aktivacije komplementa.



Sl. 1: Shematski prikaz treh različnih poti aktivacije komplementnega sistema. Različni ligandi sprožijo aktivacijo po različnih poteh. Te se združijo na nivoju molekule C3. Nastane konvertaza C5, ki iniciira končno skupno pot tvorbe MAC. Ta ima zmožnost povzročanja celične lize. Med aktivacijo nastajajo še drugi faktorji. C3a in C5a sta močna kemotaktična faktorja, ki na mesto aktivacije privabljata levkocite. C3b se veže neposredno na tarčo v procesu opsonizacije in s tem pospešuje fagocitozo. (Povzeto po Trouw *in sod.*, 2003).

### 2.3.4 Terminalna pot

Terminalna pot je skupni del vseh treh poti aktivacije. Začne se, ko se nekaj nastalega C3b veže na obstoječo konvertazo C3. Tako nastane konvertaza C5, naslednji kompleks v kaskadi. Pri cepitvi C5 nastaneta dva odlomka. C5a je najmočnejši anafilatoksin, peptidni

modulator vnetja. C5b se veže s sestavino C6 in C7. Vezava povzroči konformacijsko spremembo na molekuli C7. Izpostavi se hidrofobno območje, ki vdre v dvojno lipidno plast membrane. Naslednja stopnja je vezava ene molekule C8 v kompleks C5b6,7. Sledi vezava 10 do 16 molekul C9 v obročasto strukturo, ki jo imenujemo kompleks, ki napade membrano (MAC). MAC tvori poro v membrani s premerom  $100 \times 10^{-10}$  m, ki omogoča pretok vode in v njej topnih snovi. Na napadeni membrani se tvori več tisoč takšnih por, kar povzroči porušitev celične homeostaze in smrt celice.

#### 2.4 URAVNAVANJE DELOVANJA KOMPLEMENTA

Vse stopnje aktivacije komplementa so uravnavane in sicer na dva načina: prvi način predstavlja spontani razpad aktivnega faktorja, drugi način vključuje nov specifičen regulatorni protein, ki pospešuje ali občasno zavira spontani razpad aktivnega faktorja.

Aktivacijo na ravni C1 uravnava C1-INH, serumski glikoprotein, ki je inhibitor C1r in C1s proteaz. Je izjemno učinkovit in omejuje razpolovni čas aktiviranega C1 na 20 sekund. C4-vezavni protein (C4bp) veže do šest molekul C4b. Z vezavo blokira vezavna mesta za C2 in s tem tvorbo konvertaze C3 po klasični poti. Služi tudi kot kofaktor za encime, ki cepijo C4b. Dodatna proteina, ki sta kofaktorja za cepitev C4b, sta CR1 in MCP. Prvi je receptor za C3 na eritrocitih in levkocitih, drugi je na membrani drugih celic. DAF (Decay Accelerating Factor) je prav tako membranski protein, povzroča pa disociacijo konvertaze C3 po klasični poti (C4b2a kompleks), nima pa vloge kofaktorja. Drugo stopnjo inaktivacije konvertaze C3 vrši faktor I, topna serinska proteaza, ki v prisotnosti kofaktorjev cepi C4b na dveh mestih. Nastane topen C4c in na membrano vezan odlomek C4d. Kontrola na stopnji konvertaze C5 se vrši z istimi faktorji. C4bp in DAF pospešujeta disociacijo kompleksa. Faktor I v sodelovanju s kofaktorji pa cepi C3b na dveh mestih. V tem procesu inaktivacije se sprosti manjši odlomek C3f. Na eritrocitih se cepitev inaktiviranega C3b (iC3b) vrši še naprej. Faktor I ponovno cepi iC3b. V procesu se sprosti večji odlomek C3c, manjši C3dg pa ostane vezan na membrano.

CR1 in DAF pospešujeta tudi razpad konvertaze C3 in C5 po alternativni poti. CR1 tako, da veže C3b, DAF pa tako, da veže faktor B.

Dodatno negativno kontrolo vrši faktor H, tako da tekmuje za vezavno mesto s faktorjem B. Pozitivno kontrolo vrši properdin, ki veže C3bBb kompleks in ga ščiti pred faktorji negativne kontrole.

Tudi tvorba MAC je strogo regulirana. Faktorji kontrole so topni in membranski proteini. C5b-7 kompleks lahko naleti na več inhibitorjev. Vezava S-proteina, Sp-40,40, C8 ali lipoproteina blokira vezavno mesto za membrano. Če se C5b-7 uspe vezati na membrano, je zaščiten pred temi topnimi inhibitorji, vendar se na homolognih celicah še vedno vrši kontrola. Zelo razširjen membranski protein, ki preprečuje nastanek MAC na homolognih celicah, je CD59 protektin. Receptor se veže s C5b-8 in/ali C5b-9. Poleg inhibicije komplementa CD59 prenaša tudi signale za aktivacijo limfocitov T.

## 2.5 MBL – LEKTIN, KI VEŽE MANAN

MBL je poglavitni protein lektinske poti aktivacije komplementnega sistema. Prednostno se veže na terminalne manozne, fukozne in galaktozaminske skupine, kar omogoča, da se veže na površinske ogljikove hidrate številnih bakterij (Vozelj, 2001).

MBL spada v družino kolektinov. Za te je značilno, da vsebujejo kolageno regijo in lektinsko domeno, s katero vežejo/prepoznavajo ogljikove hidrate (Petersen *in sod.*, 2001). Poznamo štiri proteine iz te družine, ki so prisotni pri ljudeh. MBL se nahaja v plazmi, SP-A in SP-D sta surfaktantna proteina in se nahajata v pljučih ter CL-L1, ki se nahaja v citosolu hepatocitov.

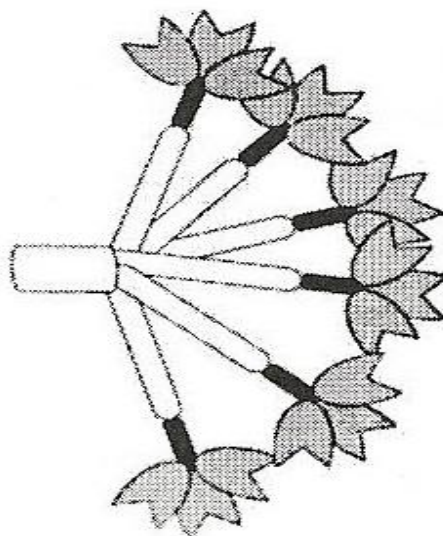
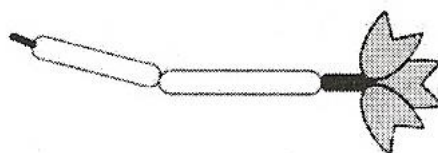
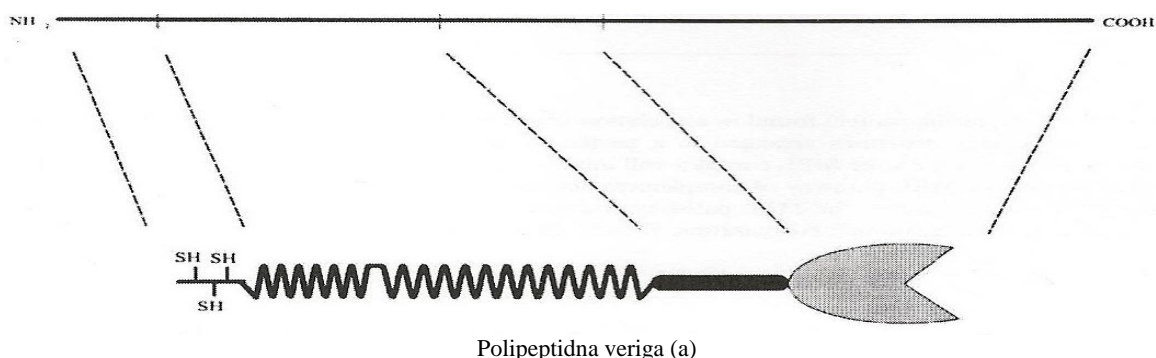
Proteini iz družine kolektinov so sestavljeni iz več enakih podenot. Posamezno podenoto sestavljajo tri identične polipeptidne verige. Na osnovnem peptidu prepoznamo štiri regije. Kratka N-terminalna regija služi navzkrižnemu povezovanju in vsebuje dva ali tri cisteinske ostanke, sledi kolagena regija variabilne dolžine, vratna regija in C-terminalna lektinska domena, oziroma domena za prepoznavanje ogljikovih hidratov (CRD). Kolagena regija človeškega MBL vsebuje osem potencialnih hidroksilacijskih mest in štiri potencialna O-glikozilacijska mesta. Trimerizacija osnovnih peptidnih verig se začne z formacijo  $\alpha$ -helične dvojno zavite strukture, ovite vijačnice (angl. coiled-coil) v vratni regiji. Končni produkt je strukturna podenota s kolageno regijo in tremi C-terminalnimi lektinskimi domenami. Nastalo podenoto stabilizirajo hidrofobne interakcije in disulfidni

mostički v N-terminalni regiji. MBL najdemo v krvi v dimerni do heksamerni obliki. Podobno kot C1 tvori strukturo v obliki šopka.

Vezava MBL na ogljikove hidrate je odvisna od  $\text{Ca}^{2+}$ . Zaradi tega uvrščamo MBL med lektine tipa C. Na posnetkih kristalnih struktur, na katerih je rekombinantni podganji MBL-A kompleksiran z oligosaharidom, se jasno vidi vloga  $\text{Ca}^{2+}$ . Pri vezavi nastane koordinacijska vez med AK in 3- in 4-OH skupinama vezanega sladkorja. Vodikove vezi med stransko verigo AK in 3- in 4-OH skupinama sladkorja so mogoče samo, če sta -OH skupini v ekvatorialni ravnini heksoznega obroča. Ta »mikro vzorec« vezave omogoča, da MBL veže nekatere monosaharide, kot so N-acetilglukozamine, L-fukoza, manoza, N-acetilmanozamin. Ne veža pa galaktoze ali sialične kisline. Pri normalnih fizioloških pogojih se MBL ne veže na lastne površine. Terminalna skupina glikanov pri ljudeh je namreč pogosto sialična kislina. Disociacijska konstanta vezave med CRD in monosaharidom je ocenjena na  $1,5 * 10^{-3}$  mol/l in kaže na šibko povezavo. Šele ligandi z več možnimi vezavnimi mesti za CRD, ki se ujemajo tudi z geometrijo oligomernih CRD v MBL se vežejo z disociacijsko konstanto primerljivo z vezavo protiteles na antigene. Pomembno je torej spoznanje, da šele kombinacija mikro in makro vzorca vezave omogoča visoko afinitetno vezavo MBL (Thiel *in sod.*, 2009). Pomanjkanje ponavljajočih se struktur ogljikovih hidratov na površini živalskih celic, ki bi ustrezale makro vzorcju vezave MBL onemogoča aktivacijo na lastnih strukturah (Petersen, 2001).



Regija za vzpostavljanje prečnih povezav      Kolagenu podobna regija      Regija vratu      Lektinska domena/domena za prepoznavanje CRD



Sl. 2: Struktura zrele polipeptidne verige MBL. Tri identične polipeptidne verige(a) se povežejo v strukturno podenoto (b). Podenoto stabilizirajo disulfidne vezi v regiji za vzpostavljanje prečnih povezav. Zaradi prekinitve v kolagenu podobni regiji (Gly-X-Y prekinitev) nastane značilen kot v zgradbi strukturne podenote. V obtočilih najdemo MBL v obliki oligomera (c). Heksamerna struktura MBL oligomera ima izpostavljenih 18 CRD, kar omogoča močno vezavo na površine mikroorganizmov (povzeto po Petersen *in sod.*, 2001).

### 2.5.1 Funkcije MBL

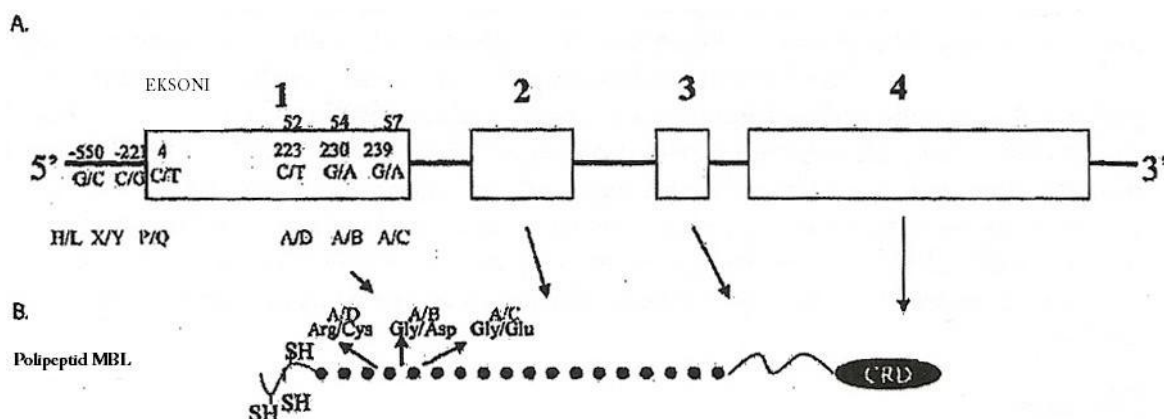
Poleg že omenjene funkcije aktivacije komplementa z novjšimi raziskavami prihajajo na dan dodatne vloge MBL. Raziskave na *Salmonella montevideo*, ki izraža z manozo-bogat O-polisaharid in virusu gripe, ki prav tako izraža z manozo-bogat oligosaharid na svoji

površini, so pokazale, da MBL v interakciji z receptorjem na površini monocitov in nevtrofilcev deluje kot opsonin. Fuji in sodelavci so leta 1985 pokazali, da nekaj linij celic glioma lahko veže MBL, ki nato uspešno aktivira komplement (Petersen, 2001). Več podatkov kaže tudi na vlogo MBL pri vnetnem odzivu. Mehanizem še ni razjasnjen, kaže pa, da MBL vpliva na sproščanje citokinov iz monocitov (Turner, 2003).

### **2.5.2 Polimorfizem MBL**

Geni, ki kodirajo proteine iz družine kolektinov, se nahajajo v skupku na kromosomu 10. Za protein MBL obstajata dva gena. *mbl-1* je psevdogen, *mbl-2* pa kodira proteinski produkt. *mbl-2* sestoji iz štirih eksonov. Ekson 1 kodira signalni peptid, s cisteinom bogato regijo in del kolagene regije, ki vsebuje veliko glicina. Ekson 2 kodira preostanek kolagene regije. Ekson 3 kodira dvojno zavito strukturo, ki tvori »vrat« proteina. Ekson 4 kodira C-terminalno lektinsko domeno, oziroma domeno za prepoznavanje ogljikovih hidratov. Konstitutivna koncentracija MBL v krvnem obtoku pri posameznikih je stabilna (Petersen *in sod.*, 2001), obstajajo pa velike razlike med posamezniki. Razpon koncentracij v plazmi sega od manj kot 50 µg/l do več kot 3 mg/l. Variacijo koncentracij pripisujemo polimorfizmu gena *mbl-2*. Mutacije se nahajajo tako v strukturalni kot promoterski regiji.

Mutacije v strukturalni regiji so vzrok točkovnih mutacij na mestu 52, 54, in 57 v eksonu 1. Te se prevedejo v zamenjave aminokislinskih ostankov na mestih 32, 34 in 37. Na mestu 32 pride do zamenjave Arg s Cys, na mestu 34 pride do zamenjave Gly z Asp, na mestu 37 pa pride do zamenjave Gly z Glu. Mutacije imenujejo D, B in C variante. Varianta A označuje divji tip (Madsen *in sod.*, 1994). Zaradi mutacij v eksonu 1 pride do prekinitve Gly-Xaa-Yaa ponovitve v kolageni regiji. Fenotipsko to izmerimo kot nižje koncentracije MBL v cirkulaciji. Za potrebe naše raziskave smo alel, pri katerem smo zasledili katerokoli od treh naštetih mutacij, označili z oznako 0.



Sl. 3: Organizacija gena MBL-2 na kromosomu 10q21. Sl. A) Prikazana sta polimorfizma promoterske regije na pozicijah -550 in -221. Tretji polimorfizem se nahaja na mestu +4 v 5' ne-prevajajoči regiji. Ekson 1 kodira 5' ne-prevajajočo regijo, signalni peptid 20 AK, N-terminalno regijo za tvorjenje prečnih povezav in prvi del kolagenu podobne regije. V tem zadnjem delu so tudi mesta mutacij, zaradi katerih nastanejo variante MBL. Ekson 2 kodira preostali del kolagenu podobne regije. Tu se nahaja tudi Gly-X-Y ponovitev. Tretji Ekson kodira regijo vratu MBL polipeptida. Zadnji Ekson kodira CRD in 3' ne-prevajano regijo Sl. B) Polipeptidna veriga MBL s prikazanimi mutacijami (povzeto po Thiel *in sod.*, 2009).

Koncentracija MBL je odvisna tudi od mutacij v promoterski regiji. Štirje haplotipi so bili povezani z različnimi nivoji MBL v plazmi. Mutacije se nahajajo na lokusih H/L, Y/X in P/Q. Točkovne mutacije promoterske regije so na mestih -550 ( G v C ) varianti H(G)/L(C), in -221 ( G v C ) varianti Y(G)/X(C). Dodatna točkovna mutacija povezana z koncentracijo MBL je na mestu +4 na 5' koncu eksona 1 ( C v T ) varianti P(C)/Q(T). Haplotipi HY, LY, in LX so povezani z visoko, srednjo in nizko koncentracijo MBL v plazmi (Petersen, 2001).

SNP-ji v promoterskem delu in eksonu 1 so v vezavnem neravnovesju. Tako obstaja sedem različnih genotipov, od teh štirje vplivajo na koncentracijo MBL. To so YB, YC, YD in XA (Thiel *in sod.*, 2009). Mutiran protein ima tudi nižjo molekulsko maso kot MBL divjega tipa. Heterozigoti izražajo v glavnem MBL z visoko molekulsko maso, vendar tudi manjše količine MBL z nizko molekulsko maso (Petersen, 2001). Popolno pomanjkanje MBL ne obstaja. Pri posameznikih z nizkimi koncentracijami MBL namreč najdemo veliko MBL z nizko molekulsko maso. MBL z nizko molekulsko maso se veže z nizko afiniteto in ne aktivira komplementa. Zaradi variabilnosti koncentracij MBL je še vedno težko definirati pomanjkljivost MBL. Danes velja, posamezniki s koncentracijo MBL manjšo od 100 ng/ml MBL imajo pomanjkljivost MBL (Thiel *in sod.*, 2009).

Promoterska regija MBL vsebuje tudi nekaj mest za modulacijo koncentracije MBL v plazmi. Pri pacientih po operaciji ali pacientih, ki imajo malarijo, se koncentracija MBL v plazmi poveča za 1,5 do 3-krat. Dvakratno povečanje so pokazali tudi pri miših, ki so jim intraperitonealno vbrizgavali LPS ali kazein. V primerjavi z klasičnim reaktantom akutne faze, se MBL izkaže za šibak reaktant akutne faze. Prav tako so opažene spremembe minimalne v primerjavi s 1000-kratnimi razlikami med posamezniki. Raziskave so pokazale tudi, da agonist akutne faze (glukokortikoid) zmanjša transkripcijo MBL. Ti podatki postavljajo pod vprašaj razumevanje proteina MBL kot reaktanta akutne faze (Petersen *in sod.*, 2001).

## 2.6 DIABETIČNA NEFROPATIJA

Diabetična nefropatija je kronična okvara ledvic pri sladkorni bolezni, za katero je značilen mikrovaskularni zaplet. Razvije se pri sladkorni bolezni tipa 1 in 2. Na razvoj diabetične nefropatije pomembno vplivajo presnovne motnje v bazalni membrani in mezangiju, znotraj ledvična hemodinamika in dedni dejavniki (Koselj *in sod.*, 1999).

V slovenskih smernicah za zdravstveno oskrbo bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2 iz leta 2008 najdemo nekoliko drugačen opis: okvara ledvic je pogost zaplet, ki pomembno vpliva na zbolewnost in preživetje bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2 in je veliko socialno in ekonomsko breme. Predstavlja pomemben vzrok za končno odpoved ledvic in označuje bolnike z zelo visokim srčno-žilnim tveganjem.

Glede na odnos med albuminurijo, ocenjeno glomerulno filtracijo in celotno klinično sliko presodimo verjetnost, da bolnik nima kronične ledvične bolezni, oziroma ima kronično ledvično bolezen, ki jo opredelimo kot diabetično ledvično bolezen ali kronično ledvično bolezen druge vrste. Sladkorni bolniki z nefropatijo torej niso homogena skupina. Njihova bolezen lahko izhaja iz več različnih razlogov, ki so lahko posledica teže, pritiska in številnih drugih dejavnikov ki spremljajo sladkorno bolezen.

Bistveni sestavni del bazalne membrane in mezangija so kolagen, heparan sulfat, laminin in fibronektin. Pri nefropatiji opazimo zvečano glikozilacijo teh proteinov, zlasti fibrinogena. Njegova sinteza je pospešena, razgradnja zavrta, količina drugih strukturnih beljakovin pa je zavrta. Bazalna membrana se zadebeli, spremeni se njen naboj in prepustnost za večje

molekule. Hiperglikemija povzroči povečan pretok plazme skozi ledvico. Poveča se glomerularna filtracija, posledica pa so tudi morfološke spremembe. Pride do hiperplazije glomerulov in kapilar. Da na razvoj nefropatije pri sladkornih bolnikih vplivajo tudi dedni dejavniki, so pokazala opazovanja dvojčkov. Če zboli eden, bo z veliko verjetnostjo zbolel tudi drugi in obratno.

Naravni potek zapleta bolezni poteka od hipertrofije s hiperfunkcijo do popuščanja delovanja. Na koncu pride do ledvične odpovedi. Po 5 do 10 letih proteinurije pride do ledvične odpovedi in smrti. Specifičnega zdravljenja ne poznamo. Osnovno je zdravljenje sladkorne in spremljajočih bolezni. Zdravljenja nefropatije ne poznamo, zato je pomembno, da odkrijemo genetske markerje, ki lahko vnaprej napovejo razvoj zapleta pri novoodkritih sladkornih bolnikih in s tem izboljšamo njihovo kakovost življenja (Koselj *in sod.*, 1999).

### **2.6.1 MBL in boleznih ledvic**

MBL se omenja v povezavi s poškodbami ledvic v primeru operacije srca. Po zunajtelesni cirkulaciji, ishemiji in reperfuziji organov pride do sistemskega vnetja, ki se lahko konča s sindromom disfunkcije multiplih organov (MODS-Multiple Organ Dysfunction Syndrome). Med te organe lahko spadata tudi ledvici. Med operacijo na srcu vedno opazimo tudi porabo MBL, ki je neodvisna od transfuzije alogene krvi. Bolniki z pomanjkljivostjo MBL ne razvije MODS (Bilgin *in sod.*, 2008). Do aktivacije preko MBL bi lahko prišlo zaradi vpliva hipoksije na ekspresijo proteinov in glikozilacijo endotelnih celic (Petersen *in sod.*, 2001). Hipoksija spremeni vzorec metabolizma glukoze, kar vpliva na razmerje nukleotidnih sladkorjev, posebno UDP-GlcNAc, katerega cikel je pomemben za strukturo glikanov in celične funkcije (Shirato *in sod.*, 2010).

Endo M. in sodelavci so leta 1998 objavili svoje izsledke, ki kažejo, da lektinska pot aktivacije komplementa pomembno prispeva k razvoju poškodb na glomerulih pri statistično značilnem številu pacientov z IgA-nefropatijo. Lhotta in sodelavci so leta 1999 pokazali prisotnost MBL z metodo direktne imunofluorescence v vzorcih ledvic pacientov obolelih za glomerulonefritisom (lupusni nefritis, membranska nefropatija, membranoproliferativni GN in anti-GBM). Vzorec obarvanja je bil enak kot pri boleznih pogojenih z navzočnostjo IgG in IgM. V razlagi svojih rezultatov menijo, da se MBL veže

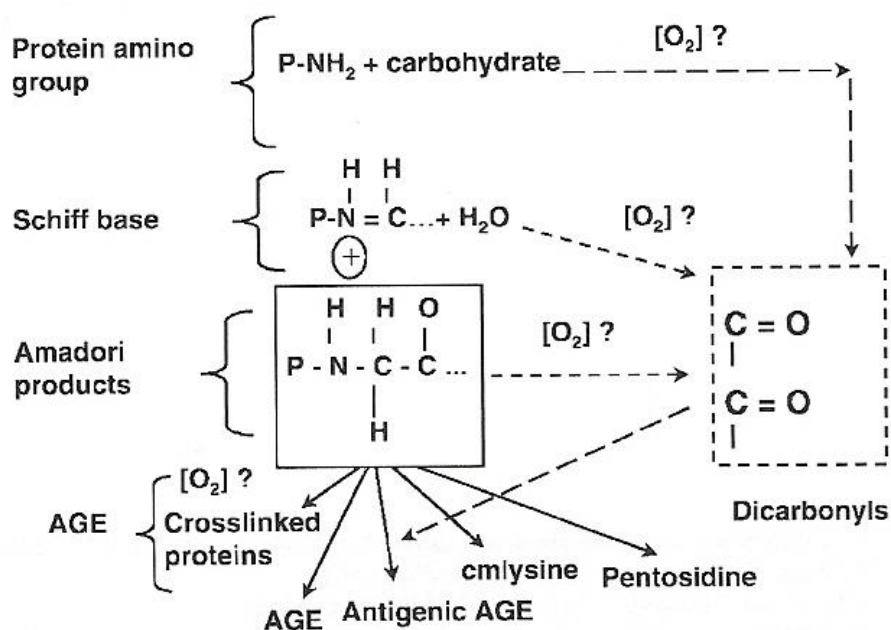
na G0-glikoform IgG. Ta oblika IgG ima namesto terminalne galaktoze N-acetilglukozamin, ki je znan aktivator MBL. Imunohistokemijske raziskave so pokazale prisotnost MBL tudi v glomerulih pacientov z nefritisom pri Henoch-Schonleinovi purpuri (Hisano *in sod.*, 2004) in post streptokoknem GN (Turner *in sod.*, 2003).

### 2.6.2 MBL in diabetična nefropatija

Ker se MBL preferenčno veže in aktivira z manozo, smo najprej pregledali možne povezave koncentracij glukoze in manoze pri diabetikih. Povezavo so pri sladkornih bolnikih pokazali Pitkanen in sodelavci leta 1996. Ugotovili so pozitivno korelacijo med glukozo in manozo pri od inzulina-odvisni (IDDM;  $r = 0.74$ ,  $P = 0.001$ ) in od inzulina-neodvisni (NIDDM;  $r = 0.89$ ,  $P = 0.001$ ) sladkorni bolezni. Pri raziskavi na psih je bila dokazana pozitivna korelacija s koncentracijo glukoze in manoze ter manoze in fruktozamani (Mori *in sod.*, 2009). Manozna lahko nastaja iz glukoze, ki jo dobimo s prehrano ali pa z razgradnjo hepatičnega glikogena. Ker je metabolizem hepatičnega glikogena odvisen od inzulina, pričakujemo vpliv na koncentracijo manoze pri sladkornih bolnikih.

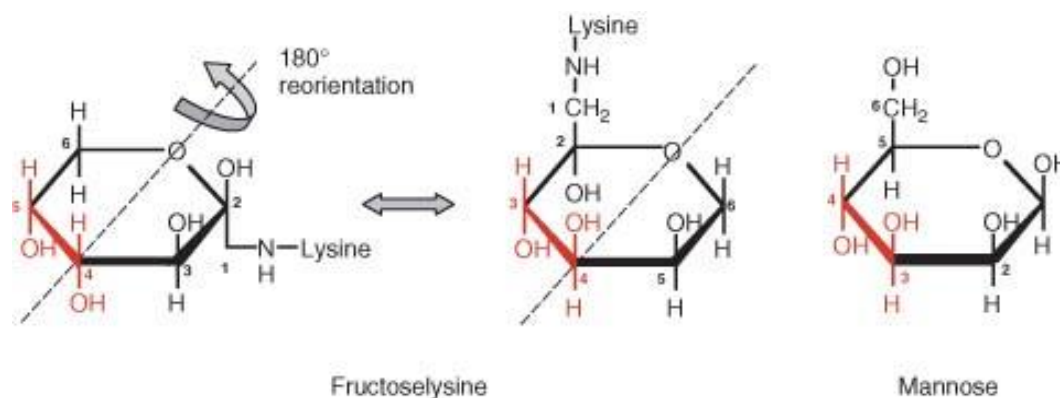
Velik delež sladkornih bolnikov razvije diabetično nefropatijo. Del populacije bolnikov pa je navidez odpornih proti temu kroničnemu zapletu sladkorne bolezni. Aktivacija komplementa po lektinski poti in posledično vnetje naj bi bila povzročitelja zapleta, ki ga karakterizira albuminurija  $> 3000$  mg/24 h. Prvo nam znano študijo so objavili Hovind *in sod.* leta 2005. Pokazali so, da so visoke koncentracije MBL, povezane z divjim tipom gena *mbl-2*, v serumu zgodaj v razvoju diabetesa tipa 1 značilno povezane s kasnejšim razvojem mikro ali makroalbuminurije. To povezavo so na velikem vzorcu 1297 sladkornih bolnikov preverili Kaunisto in sodelavci leta 2009. Pokazali so, da je 19 SNP-jev povezanih s koncentracijo MBL. Koncentracije so bile višje pri pacientih z makroalbuminurijo v primerjavi s pacienti brez nefropatije. Ne glede na to, pa niso našli dokazov za povezavo kateregakoli SNP-ja ali haplotipne kombinacije in diabetično nefropatijo. Menijo, da je visoka koncentracija MBL pri pacientih z nefropatijo odraz kroničnega vnetja nizke jakosti. Ali je marker MBL povezan s kakšnim drugim faktorjem, ki pripomore k razvoju nefropatije, ali pa je njena posledica, niso ugotovili.

Čeprav je jasno, da je MBL povezan z aktivacijo komplementa pri hiperglikemiji, natančna vzročna povezava še ni razjasnjena. Znano je, da glukoza spontano reagira z amini s katerimi tvori stabilne ketoamine ali fruktozamine. Nastajajo v neencimatski Maillardovi reakciji, ki vključuje nestabilno Schiffovo bazo in Amadorijeve produkte. Ta proces je proporcionalen z koncentracijo glukoze v krvi in zaradi tega povečan pri sladkorni bolezni (Fortpied *in sod.*, 2010).



Sl. 4: Maillard-ova reakcija. Potek *in vitro* reakcij nastanka antigenih AGE (povzeto po Wautier, 2001).

Produkti neencimske glikozilacije in oksidacije proteinov in lipidov, napredni končni produkti glikacije (AGE-Advanced Glycation End Products), nastajajo in se akumulirajo v mnogih različnih okoliščinah. Nastajajo lahko hitro, ali pa v daljšem časovnem obdobju iz različnih razlogov. AGE aktivirajo številne receptorje (RAGE) imunoglobulinske naddružine. Mnogo teh receptorjev je že identificiranih. To so laktoferin, »prestrezni« (»scavenger«) receptorji tipa 1 in 2, OST-48, fosfoprotein80K-H, galektin-3 in CD36. Preko teh interakcij AGE sodelujejo pri vnetnih procesih in njihovih posledicah (Ramamsamy *in sod.*, 2005). Rezultati inkubacije čistega humanega MBL na mikrotitrskih ploščah s kovalentno vezanim frukto-lizinom, ki spada v skupino AGE, kažejo pozitivno koncentracijsko odvisno vezavo MBL na frukto-lizin. Aktivacija komplementa na ploščicah s frukto-lizinom je genotipsko odvisna in proporcionalna serumski koncentraciji MBL (Fortpied *in sod.*, 2010). Glukoza se po vstopu v telo pretvarja v fruktoza-6-fosfat.



Sl. 5: Struktura frukto-lizina in manoze. Obe molekuli sta predstavljeni v njuni  $\beta$ -piranozni konformaciji. Frukto-lizin je rotiran za  $180^\circ$ , da lažje vidimo podobnost z manozo. Ogljikovi atomi pomembni za prepoznavanje z MBL so v rdeči barvi. Povzeto po (Fortpied *in sod.*, 2010)

Vloga AGE pri diabetični nefropatiji je že dokazana. Vnos albumina, ki so ga spremenili z AGE, v normalne miši po štirih tednih izzove glomerularno hipertrofijo. Miši, ki so z AGE dobivale še aminoguanidin, to je inhibitor tvorbe AGE, so bile zaščitene pred temi poškodbami. Tudi drugi inhibitorji akumulacije AGE v ledvicah, kot je ALT-946, so učinkoviti pri preprečevanju in ustavljanju napredovanja diabetične nefropatije v živalskih modelih.

Aminoguanidin je diamin oksidaza in inhibitor nitrooksid sintaze. Deluje na zmanjšanje nivoja AGE preko interakcije z 3-deoksiglukozonom. Ta je prekursor za nastanek AGE kot so imidazolon, piralin, N6-(karboksimetil)lizin in pentozidin (Monier *in sod.*, 1981).



### **3 CILJ NALOGE**

Ugotoviti vlogo komplementnega sistema pri nastanku diabetične nefropatije.

Dokazati povezavo med količino proteina MBL, genotipom in nastankom diabetične nefropatije.

Potrditi hipotezo, da je pri nastanku diabetične nefropatije pomembna zmožnost aktivacije komplementnega sistema po lektinski – mananski poti.

Razviti metodologijo za ugotavljanje nagnjenost k diabetični nefropatiji.

## **4 MATERIALI IN METODE**

### **4.1 DOLOČANJE AKTIVNOSTI KOMPLEMENTNEGA SISTEMA PO KLASIČNI POTI**

#### **4.1.1 Pufri**

##### Veronalni pufer: 5 x VBS

1 l destilirane vode

0,64 g dietilbarbitonske kisline

0,31 g natrijevega 5,5-dietilbarbitonata

8,5 g NaCl

##### Pufer za redčenje vzorcev

1 l veronalnega pufra

22,05 mg  $\text{CaCl}_2$

101,65 mg  $\text{MgCl}_2$

1 g želatine

##### Pufer za pripravo ovčjih eritrocitov

1 l veronalnega pufra

1,76 g EDTA

1 g želatine

#### **4.1.2 Pripomočki**

- Vzorci seruma
- Ovčji eritrociti
- Mikrotitrna plošča s konkavnim dnom

- Mikrotitrna plošča z ravnim dnom
- Centrifuga
- Vodna kopel
- Multikanalni spektrofotometer

#### 4.1.3 Izvedba

Ovčjo vensko kri dodamo po odvzemu k polovičnemu volumnu Alseverjeve raztopine. Hranimo jo pri 0 °C. Pred testiranjem speremo eritrocite trikrat v pufru 2. V 50 ml centrifugirko odpipetiramo 20 ml ovčjih eritrocitov in dodamo 30 ml pufru 2. Rahlo premešamo z roko in centrifugiramo pri 2.400 obr/min 5 minut. Postopek ponovimo trikrat. Supernatant po vsakem centrifugiranju odpipetiramo in nadomestimo z 30 ml pufru 2. Zadnji sediment razredčimo z 80 ml pufru 3. Odvzamemo 0,1 ml vzorca tako pripravljene razredčine in jo razredčimo v 1,4 ml destilirane vode. Izmerimo OD pri 550 nm.

Za testiranje potrebujemo senzibilizirane eritrocite v koncentraciji  $5 \times 10^8$ /ml. Volumen eritrocitov, ki jih želimo senzibilizirati (H), glede na predviden volumen, ki ga potrebujemo (X), izračunamo po naslednji enačbi.

$$H = \frac{OD}{0,75} \times X$$

Volumen hemolizina (A), ki ga je potrebno dodati za 1 ml ovčjih eritrocitov, izračunamo po naslednji enačbi.

$$A = \frac{H}{300}$$

Za markiranje uporabimo eritrocite v dvojnem volumnu pufru 3.

$$H \times 2 + A$$

Mešanico inkubiramo pri 37 °C 20 minut. Pred uporabo eritrocite ponovno speremo v pufru 2 trikrat pri 2400 obr/min in ponovno določimo število eritrocitov za uporabo.

$$Eu = H \times 2$$

V 2, 3, 5 in 6 stolpec vdolbinic na mikrotitrski plošči s konkavnim dnom odpipetiramo po 150  $\mu$ l pufru 2. V prvi stolpec odpipetiramo 240  $\mu$ l in v četrtega 290  $\mu$ l pufru 2. V vdolbinice prvega stolpca nato odpipetiramo po 60  $\mu$ l in v vdolbinice 4 stolpca po 10  $\mu$ l vzorcev plazme. Iz vdolbinic prvega stolpca prenašamo po 150  $\mu$ l razredčenih vzorcev v 2, 3 in 5 stolpec. Zadnjih 150  $\mu$ l zavržemo. Iz vdolbinic 4 stolpca prenesemo 150  $\mu$ l razredčenega vzorca v 6 stolpec. Zadnjih 150  $\mu$ l zavržemo. Tako smo v stolpcih 1-6 dobili različne razredčine vzorcev : 0,2 ; 0,1 ; 0,05 ; 0,33 ; 0,25 ; 0,17

Za kontrolo izvedemo slepi test, 50 % hemolizo in 100 % hemolizo. V vdolbinico za slepi test odpipetiramo 150  $\mu$ l pufru 2, za 50 % in 100 % hemolizo odpipetiramo 175  $\mu$ l destilirane vode v dve vdolbinici.

Dnevno kontrolo izvedemo z vzorcem preiskovanca od prejšnjega dne. Razredčine pripravimo kot za ostale vzorce. Rezultate dnevne kontrole primerjamo z rezultati za isti vzorec, ki smo jih dobili prejšnji dan. Rezultata testiranja se ne smeta razlikovati za več kot 10 % +/-

V vdolbinico za 50 % hemolizo odpipetiramo 37,5  $\mu$ l eritrocitov. V vse ostale odpipetiramo po 75  $\mu$ l eritrocitov. Pipetiramo z avtomatsko pipeto od najmanjše proti največji koncentraciji z istim nastavkom. Mikroploščo stresemo in inkubiramo 90 minut v vodni kopeli na 37 °C.

Po inkubaciji plošče centrifugiramo pri 1100 obr/min 5 min. Po 100  $\mu$ l supernatanta prenesemo iz vsake vdolbinice na mikrotitrsko ploščo z ravnim dnom in izmerimo OD pri 504 nm. Rezultati so podani glede na 50 % lizo, ki je nastavljena kot točka 100 % aktivacije.

## 4.2 DOLOČANJE AKTIVNOSTI KOMPLEMENTNEGA SISTEMA PO ALTERNATIVNI POTI

### 4.2.1 Pufri

#### GVB raztopina za pripravo pufrov

200 ml 5 x VBS

10 ml 10 % želatine

Destilirana voda do oznake 1000 ml

#### D5W raztopina za pripravo pufrov

50 g D-glukoze

1000 ml destilirane vode

#### DBVG raztopina za pripravo pufrov

270 ml D5W

90 ml GVB

#### Pufer EDTA za ustavitev reakcije

58 mmol/l EDTA

442 ml GVB

#### Mg-EGTA pufer

20 ml 100 mmol/l EGTA

14 ml 100 mmol/l MgCl<sub>2</sub>

166 ml DGVB

### 4.2.2 Pripomočki

- Epruvete

- Stojalo za epruvete
- Mikrotitrna plošča z ravnim dnom
- Multikanalni spektrofotometer
- Vzorci plazme
- Standard – normalni humani serum
- Kunčji eritrociti

### 4.2.3 Izvedba testa

Kunčjo kri dodamo po odvzemu iz srca k enakemu volumnu Alseverjeve raztopine. Hranimo jo pri 0° C. Pred testiranjem speremo eritrocite trikrat v pufri 4. Nato jih resuspendiramo v istem mediju in inkubiramo pri 37 °C 15 minut. Nato jih speremo še trikrat v pufri 5 in po zadnjem centrifugiranju sedimentu dodamo pufer 5 do oznake 40 ml.

0,1 ml tako pripravljene krvi dodamo k 0,9 ml pufra 5. Odvzamemo 0,1 ml in dodamo 2,9 ml destilirane vode in izmerimo OD pri 405 nm.

Kunčja kri z OD 0,294 vsebuje  $1 \times 10^8$ /ml eritrocitov. Konkretno število eritrocitov v mililitru aktualnega vzorca izračunamo s sklepnim računom.

$$X = \frac{1 \times 10^8 \text{ ml} \times OD}{0,294}$$

Primerna koncentracija kunčjih eritrocitov za test je  $4 \times 10^8$ /ml.

Za izvedbo testa pripravimo pet razredčin plazme v pufri 5. V vse epruvete razen v prvo pipetiramo po 500 µl v prvo pa 875 ml pufra 5. V prvo epruveto pipetiramo 125 µl plazme. Dobro premešamo in v naslednjo epruveto prenašamo po 500 µl vzorca. Zadnjih 500 µl zavržemo. Enako pripravimo tudi standardni vzorec in vzorec za dnevno kontrolo. Tako dobimo pet razredčin: 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128

Za kontrolo izvedemo slepi test, 50 % hemolizo in 100 % hemolizo. V epruveto za slepi test odpipetiramo 500 µl pufra 5, za 50 % in 100 % hemolizo odpipetiramo 1400 oziroma 1300 µl destilirane vode.

V vse epruvete razen 100 % hemolize in slepi test, odpipetiramo po 100 µl kunčjih eritrocitov. V epruveto za 100 % lizo odpipetiramo 200 µl kunčjih eritrocitov. V epruveto za slepi test eritrocitov ne dodamo.

Epruvete v stojalu dobro premešamo in inkubiramo 60 minut v vodni kopeli pri 37 °C. Po inkubaciji dodamo 400 µl pufra 4 za ustavitev reakcije. Centrifugiramo 5 minut pri 2.400 obr/min. Supernatant prenesemo v mikrotitrsko ploščo z ravnim dnom in izmerimo OD pri 504 nm. Rezultati so podani glede na 50 % lizo, ki je nastavljena kot točka 100 % aktivacije.

#### 4.3 DOLOČANJE AKTIVNOSTI KOMPLEMENTNEGA SISTEMA PO LEKTINSKI POTI

Za določanje aktivnosti po lektinski poti smo uporabili Quantikine Human MBL kit proizvajalca R&D Systems.

##### 4.3.1 Pufri

###### Spiralni pufer

20 ml koncentrata spiralnega pufra

480 ml deionizirane vode

###### Kalibrator diluent RD5-26

20 ml koncentrata Kalibrator diluent RD5-26

60 ml deionizirane vode

###### Assay diluent RD1-21

##### 4.3.2 Ostale raztopine

###### Vzorci

Vzorce plazme redčimo do koncentracije 1:400 s kalibrator diluentom RD5-26.

### MBL Standard

Standard rekonstituiramo v 1 ml kalibrator diluenta RD5-26. Dobljeno raztopino uporabimo za pripravo razredčin. Redčimo s kalibrator diluentom RD5-26. V prvo epruveto odpipetiramo 900  $\mu$ l diluenta. V ostalih 6 epruvet odpipetiramo po 500  $\mu$ l diluenta. V prvo epruveto dodamo 100  $\mu$ l rekonstituiranega standarda. Dobro premešamo in v naslednje epruvete prenašamo po 500  $\mu$ l vzorca.



#### MBL konjugat

12,5 ml mišjih monoklonskih protiteles proti MBL konjugiranih s hrenovo peroksidazo.

#### Barvni reagent A

12,5 ml stabiliziranega vodikovega peroksida.

#### Barvni reagent B

12,5 ml stabiliziranega kromogena (tetrametilbenzidin).

#### Raztopina za zaustavitev reakcije

23 ml razredčene klorovodikove kisline.

### **4.3.3 Pripomočki**

- pipete
- stresalnik
- avtomatski spiralnik
- MBL polistirenska mikroplošča z nanešenimi monoklonskimi protitelesi proti MBL

### **4.3.4 Potek testa**

Najprej v vsako vdolbinico mikroplošče nanesemo po 50  $\mu$ l Assay diluenta RD1-21. Zatem nanesemo vzorce in standarde po 50  $\mu$ l na vdolbinico. Vzorce in standarde nanašamo v dvojniku. Poleg redčitev standardov nanesemo še slepi test, ki vsebuje samo kalibrator diluent RD5-26. Ploščo pokrijemo in jo za dve uri postavimo na stresalnik (0,12 inčna orbita) pri 500 Hz pri sobni temperaturi.

Po inkubaciji speremo štirikrat s spiralnim pufrom. Po spiranju obrnemo ploščo in jo pritisnemo ob čisto papirnato brisačo. Za dobre rezultate je pomembno, da popolnoma odstranimo spiralni puffer.

100  $\mu$ l MBL konjugata dodamo v vsako vdolbinico, pokrijemo in inkubiramo na stresalniku dve uri pri sobni temperaturi. Po inkubaciji ponovimo spiranje kot v predhodnem koraku.

100 µl raztopine Substrata dodamo v vsako vdolbinico. Raztopino substrata pripravimo tako, da raztopini A in B zmešamo skupaj v enakih volumnih tik pred nanašanjem. Inkubiramo 30 minut v temi na delovnem pultu.

Po inkubaciji v vsako vdolbinico nanese po 100 µl raztopine za zaustavitev reakcije. OD izmerimo najkasneje v 30 minutah po zaustavitvi reakcije. OD merimo pri 450 nm.

#### 4.4 DOLOČANJE KONCENTRACIJE DELCA SC5b-9

##### 4.4.1 Pufri

###### Pufer za vezavo anti-hu C5b-9

Kapsula (C-3041, Sigma chemicals, St. Louis, MO, ZDA) vsebuje 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaCO<sub>3</sub>; pH = 9,6.

Vsebino kapsule stresemo v 100 ml deionizirane vode. Za eno ploščico potrebujemo 6 ml pufra.

###### Spiralni pufer

Vrečka (P-3563, Sigma chemicals, St. Louis, MO, ZDA) vsebuje PBS in 0,1 % Tween 20.

Vsebino vrečke stresemo v 1000 ml deionizirane vode. Za eno ploščico potrebujemo 400 ml pufra.

###### Pufer za prekrivanje prostih mest

Vrečka (P-3813, Sigma chemicals, St. Louis, MO, ZDA) vsebuje PBS in 1 % BSA.

Za pripravo osnovnega pufra 3. Vsebino vrečke stresemo v 1000 ml deionizirane vode.

Za pripravo pufra 3 v 25 ml osnovnega pufra dodamo 0,25 g BSA. Pufer pripravimo dan pred uporabo zaradi slabe topnosti BSA. Za eno ploščico potrebujemo 20 ml pufra.

###### Pufer za redčenje vzorca

20 ml osnovnega pufra 3.

0,2 g BSA

0,06 g Na<sub>2</sub>EDTA

Pufer pripravimo dan pred uporabo zaradi slabe topnosti BSA in EDTA. Za eno ploščico potrebujemo 20 ml pufra.

#### Pufer za pripravo substrata

Tableta OPD kromogen ( S2045, Dako, SDK-2600 Glostrup, Denmark) vsebuje 3.52 mg 1,2-phenilendiamin dihidroklorida, kar ustreza 2 mg OPD. Tableto raztopimo v 6 ml deionizirane vode in dodamo 2,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **4.4.2 Protitelesa**

#### Primarna protitelesa

V 6 ml pufra 1 dodamo 4 µl anti-hu C5b-9 protiteles.

#### Sekundarna protitelesa

V 6 ml pufra 2 dodamo 6 µl anti-hu C5 protitelesa (Dako, A0055) in 120 µl mišjega seruma.

#### Terciarna protitelesa

V 6 ml pufra 2 dodamo 6 µl anti IgG protiteles (kozja, anti kunčja IgG protitelesa označena s peroksidazo – Dako, P0448).

### **4.4.3 Ostale raztopine**

#### Standard

V prvi stopnji redčimo 25 µl standarda (Mac) z 41 µl pufra 4. Nato redčimo še v razmerju 1:10. Sledi redčenje 1:2. Pripravimo 9 razredčin, ki jih bomo nanašali na ploščico. 1:80 do 1:20480.

#### Vzorci

Plazmo redčimo v razmerju 1:10. 15 µl vzorca dodamo v 135 µl pufra 4. Vzorcev urina z EDTA ne redčimo.

### Raztopina za zaustavitev reakcije

12,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Za eno ploščico rabimo 6 ml raztopine.

#### **4.4.4 Pripomočki**

- mikrotitrna plošča Costar z ravnim dnom
- pipete
- avtomatski spiralec
- stresalnik
- večkanalni spektrofotometer

#### **4.4.5 Potek testa**

Dan pred testom pripravimo pufer 3 in 4. Vdolbinice na ploščici prelijemo s primarnimi protitelesi (50 µl). Ploščico inkubiramo preko noči pri 4 °C. Drugi dan zjutraj ogrejemo reagente na sobno temperaturo. Ploščico dvakrat speremo s spiralnim pufrom (pufer 2). V vsako luknjico odpipetiramo 250 µl spiralnega pufra – spiramo ročno, da preprečimo prekomerno odlepljanje vezočih protiteles. Sledi blokada prostih mest. V vse luknjice napipetiramo po 200 µl pufra 3. Ploščico inkubiramo 1 uro pri sobni temperaturi. Med inkubacijo pripravimo vzorce in standard.

Po končani inkubaciji blokade prostih mest ploščico enkrat speremo s pufrom 2. Dodamo vzorce in standarde po 50 µl na vdolbinico in inkubiramo eno uro pri sobni temperaturi. Standarde in vzorce nanašamo v dvojniku. V vdolbinico za slepi test (BL) dodamo 50 µl spiralnega pufra. Za dnevno kontrolo naneseemo že pripravljen vzorec na prvo in zadnje mesto.

Med inkubacijo pripravimo sekundarna protitelesa. Po končani inkubaciji z vzorci ploščico trikrat speremo s pufrom 2. V vse vdolbinice razen v BL dodamo po 50 µl pripravljenih sekundarnih protiteles. Ploščico inkubiramo eno uro pri sobni temperaturi.

Tik pred dodajanjem na ploščico pripravimo terciarna protitelesa. Po končani inkubaciji ploščico trikrat speremo s pufrom 2 in dodamo po 50 µl terciarnih protiteles. Ploščico inkubiramo 1 uro pri sobni temperaturi.

Substrat pripravimo tik pred dodajanjem na ploščico. Po končani inkubaciji ploščico trikrat speremo s pufrom 2 in v vse luknjice dodamo po 50  $\mu$ l pripravljenega substrata. Ploščico inkubiramo 30 minut pri sobni temperaturi.

Sledi zaustavljanje reakcije. V vsako vdolbinico dodamo po 50  $\mu$ l raztopine za ustavljanje reakcije in izmerimo optično gostoto pri 492/620 nm.

#### 4.5 DOLOČANJE KOLIČINE DELCA C3d/dg KOMPLEMENTNEGA SISTEMA

##### 4.5.1 Pufri

###### PBS-EDTA puffer

4 g NaCl

0,575 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

2,79 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,1 g  $\text{Na}_2$  EDTA

###### TRIS barbital puffer

443 g Dietilbarbiturna kislina

3,5 l Destilirane vode

##### 4.5.2 Agar za vgrajevanje protiteles proti C3d (A063) in C3c (A062)

###### Raztopina 1

2 g Lites Agarose

7,5 g PEG 6000

250 ml TRIS barbital puffer

Raztopimo s kuhanjem!

###### Raztopina 2

443 g TRIS barbital puffer

5,33 g Ca laktat

6,5 g Na azid

2 l Destilirane vode

Raztopini 1 in 2 združimo in dopolnimo do 10 l z destilirano vodo; pH = 8,6. Uporabljamo redčeno 1:4 z destilirano vodo.

#### Protitelesa

- Protitelesa proti C3d DAKO (A063)
- Protitelesa proti C3c DAKO (A062)

#### C3d/dg Standard

Pripravljamo ga sami in umerjamo na standard, ki smo ga dobili v laboratoriju za diagnostiko komplementa Imunološkega instituta Univerze v Heidelbergu (Nemčija) – prof. Michael Kirschfink. Nemški standard ima aktivnost 15000 mU/l.

Serum pripravimo iz 200 ml venske krvi. Dodamo Na azid do koncentracije 15 mM. Inkubiramo pet dni pri temperaturi 37 °C.

Tako pripravljen standard ima aktivnost 1 U/l C3d. V testu uporabimo razredčino v PBS-EDTA 1:5. 1 del standarda + 4 deli PBS-EDTA. aktivnost 200 mU/l.

#### **4.5.3 Pripomočki**

- steklena ploščica 10\*10 cm
- rezilo
- filter papir
- električna pečica
- usmernik

#### **4.5.4 Potek testa**

Stekleno ploščo prekrijemo s 16 ml vroče agaroze. Počakamo, da se agarozna strdi. Nato z rezilom zarežemo prvi del agaroze, ga nadomestimo z 4,5 ml agaroze + 135 µl protiteles proti C3c. Tako blokiramo molekule C3c in omogočimo molekulam C3d, da nadaljujejo pot v drugi del gela, ki ga nadomestimo z 9 ml agaroze + 45 µl protiteles proti C3d. Nastanejo imunski kompleksi, ki potujejo v električnem polju in se naslednji dan vidijo kot izpuhi raket.

Naslednji dan omočimo filter, ga položimo na ploščico in obtežimo, da se agarozna vpije. Na ploščici ostane le tanka plast gela, ki ga posušimo z vročim zrakom. Ploščico pobarvamo s Coomassie blue, ter razbarvamo z pripravkom za razbarvanje. Nazadnje ploščico posušimo in z merjenjem višine raket določimo rezultate.

#### **4.6 DOLOČANJE KONCENTRACIJE DELCA C4d KOMPLEMENTNEGA SISTEMA**

Za določanje koncentracije C4d smo uporabili MICROVUE C4d Odlomek EIA Kit proizvajalca QUIDEL.

##### **4.6.1 Pufri**

###### Pufer 1 za spiranje

PBS, 1% Tween-20, 0.035 % ProClin 300. Pufer pripravimo tako, da 50 ml raztopine razredčimo do oznake 1 l z destilirano vodo.

###### Pufer 2 za redčenje vzorcev

PBS, 0.05 % Tween-20, Stabilizator proteinov, 0.035 % ProClin 300

###### Pufer 3 za redčenje substrata

0.1 M Citratni pufer, 0.05 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

##### **4.6.2 Ostale raztopine**

###### C4d konjugat

Kozji anti-Human C4d konjugiran s peroksidazo v HRP pufru.

### Reagent za hidratiziranje

0.035 % ProClin 300

### Koncentrat substrata

0.7 % 2-2-Azino-di-(3-etilbenzotiazolin sulfonilna kislina) diamonijeva sol

### C4d standardi z oznakami A, B, C, D, E

Standard je liofiliziran človeški serum z znano koncentracijo C4d v PBS in stabilizator proteina. Standarde pripravimo tako, da 2 ml regenta za hidratiziranje dodamo v fiole z oznakami A do E. Rekonstitucija naj poteka vsaj 15 min.

### Kontrola High/Low z oznakami H, L

Človeški serum z C4d raztopljen v PBS in stabilizatorju proteina. Kontrole pripravimo tako, da 2 ml regenta za hidratiziranje dodamo v fiole z oznakama H in L. Rekonstitucija naj poteka vsaj 15 minut.

### Raztopina za ustavljanje reakcije

250 mM oksalna kislina

#### **4.6.3 Pripomočki**

- avtomatski spiralnik
- pipete
- večkanalni spektrofotometer

#### **4.6.4 Priprava vzorcev**

Vzorci seruma redčimo v razmerju 1:70 s pufrom 2. Vzorce urina ne redčimo.

#### **4.6.5 Potek testa**

Najprej nanese po 300 µl pufra 1 v vdolbinice mikroplošče. Inkubiramo eno minuto pri 30 °C. Po inkubaciji speremo dvakrat s pufrom 1. Po 100 µl pufra 2 ( za slepi test ), standardov, kontrol in razredčenih vzorcev nanese v vdolbinice. Inkubiramo 30 minut pri 30 °C in speremo pet krat s pufrom 1.



Po spiranju nanese po 50  $\mu$ l konjugata C4d v vse vdolbinice. Inkubiramo 30 minut pri 30 °C. Raztopino substrata pripravimo tik pred uporabo. 500  $\mu$ l koncentrata substrata raztopimo v 10 ml pufra 3. Po inkubaciji konjugata nanese po 100  $\mu$ l pripravljene raztopine substrata v vse vdolbinice in inkubiramo 30 minut pri 30 °C.

Po inkubaciji substrata nanese v vdolbinice po 50  $\mu$ l raztopine za zaustavitev reakcije in izmerimo OD pri 405 nm.

#### 4.7 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SESTAVINE C3 in C4 KOMPLEMENTNEGA SISTEMA

Za določanje koncentracije delcev C3 in C4 smo uporabili komplet za metodo RID, proizvajalca The Binding Site.

##### 4.7.1 Raztopine

Kalibratorske raztopine: set treh raztopin, ki vsebujejo veliko srednjo in majhno koncentracijo C3 oziroma C4.

7 % raztopina govejega seruma se uporablja po potrebi za redčenje.

Kontrolni serum vsebuje znane koncentracije C3 oziroma C4 in se uporablja za kontrolo testa.

##### 4.7.2 Pripomočki

- Ploščici RID za določanje C3 in C4
- Pipeta
- Ročno merilno povečevalo

##### 4.7.3 Potek testa

Ploščici RID vsebujeta monospecifična protitelesa proti C3 oziroma C4 v agaroznem gelu. V luknjice v gelu nanašamo po 5  $\mu$ l vzorca. Vzorcev ponavadi ne redčimo. Po nanosu ploščico inkubiramo 48 ur. V tem času antigen difundira v okolico in s protitelesi iz gela tvori imunske komplekse. Ti so vidni kot obroček okrog luknjice v katero smo nanegli vzorec. Rezultat dobimo tako, da izmerimo premer obročka in ustrezno vrednost odčitamo iz tabele, ki jo zagotovi proizvajalec RID ploščic. V primeru, da obroček doseže

maximalno velikost, ga lahko razredčimo s priloženim govejim serumom. Če je koncentracija antigena pod nivojem detekcije, naneseemo dvakratni volumen vzorca.

#### 4.8 GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA POSAMEZNIH NUKLEOTIDOV

Z ugotavljanje SNP-jev smo uporabili Type-it HRM PCR komplet proizvajalca QIAGEN.

##### 4.8.1 HRM PCR Master mix

- HotStarTaq Plus DNA Polimeraza
- Type-it HRM PCR Buffer (z EvaGreen barvilom)
- Q-raztopina
- dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, DTTP)

##### Rnaze-Free voda

##### 4.8.2 Pripomočki

- Corbert REASERCH Rotor-Gene 6000
- Optične PCR epruветke
- Avtomatske pipete in nastavki ( Dnase free)
- Primerji

##### 4.8.3 Potek testa

HRM PCR Master Mix, raztopino oligonukleotidnih začetnikov, vodo brez RNAze in vzorce z izolirano matrično DNA spravimo na sobno temperaturo. Pomembno je, da vse raztopine dobro premešamo, da se izognemo lokalno višjim koncentracijam soli. Reakcijsko raztopino pripravimo tako, da zmešamo 12,5 µl HRM PCR Master Mix 1,75 µl raztopine primerjev v koncentraciji 10µM (vsebuje 10 µM koncentracijo 5'- in 10 µM 3'-začetnikov), matrično DNA (pomembno je, da za vse reakcije porabimo enak volumen) v koncentraciji 1-50 ng na 25 µl reakcijske raztopine. Dopolnimo z vodo brez RNAze do 25 µl.

Naslednji korak je programiranje Real-Time PCR naprave. Nastavimo na priporočene vrednosti iz tabele .

Pregl. 4: Nastavitve programa za HRM PCR (Povzeto po Qiagen 2009. Type-it HRM PCR Handbook)

<b>Korak</b>	<b>Čas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Komentar</b>
<b>Prvotni korak aktivacije PCR</b>	5 min.	95°C	HotStarTaq Plus DNA polimeraza se aktivira pri tej temp.
<b>Kroženje v 2 korakih</b>	10 s	95°C	
1.Denaturacija			
2.Naleganje/Podaljševanje	30 s	57°C	Čas je primeren za produkte <350 bp. Za produkte >350 bp dodamo 1s/25bp dolžine
<b>Število ciklov</b>	40		
<b>HRM</b>	2 s	65°C-95°C s koraki po 0,1°C	Pridobivanje podatkov

## 5 REZULTATI

Pregl. 5: Pacienti z diabetično nefropatijo. Neobjavljeni rezultati (Kotnik *in sod.*, 2006)

ID	CH50 [%]	APH50 [%]	SC5b-9 - urin [µg/L]	Serumski kreatinin (mg/L)	Proteinurija (g/dan)
MAB	68	105	<min	435	0,31
ŠA	127	75	<min	248	0,32
VB	107	145	<min	133	0,54
PA	136	102	22	174	0,75
ZS	109	151	/	194	1,01
LJ	34	115	495	216	1,17
AM	95	106	11	321	1,62
ČV	147	128	14	227	1,67
PF	141	137	268	195	1,93
VD	125	109	147	262	2,29
PA	159	138	17	464	3,33
KM	67	84	665	252	3,88
PS	122	111	7	200	4,07
CJ	143	158	3688	189	6,13
ŠN	212	165	7906	212	8,18
HAR	115	139	1129	452	8,48

Pregl. 3 prikazuje neobjavljene rezultate preiskav komplementa pri pacientih (ID) z diabetično nefropatijo. Za te bolnike niso bile opravljene preiskave proteina MBL. Za našo raziskavo so zanimivi rezultati MAC v urinu. Pri sedmih vzorcih od šestnajstih so koncentracije MAC v urinu višje od 30 µg/l, kar imamo za povišano vrednost. Povišane vrednosti ne izhajajo iz aktivacije komplementa po klasični ali alternativni poti. Prav to nas je napeljalo k misli, da je morda tudi lektinska pot aktivacije komplementa soodgovorna za nastanek diabetične bolezni ledvic.

### 5.1 ZNAČILNOSTI KONTROLNE SKUPINE PREISKOVANCEV

Dvaindvajsetim navidezno zdravim preiskovancem smo odvzeli 5 ml krvi v epruveto z EDTA. Vzorce smo centrifugirali in pridobljeno plazmo delili v dve fioli za vsak vzorec. Deset vzorcev smo zamrznili takoj po obdelavi, enajst vzorcev pa smo štiri dni hranili v hladilniku na +4 °C in jih nato zamrznili.

Zorin A. Vloga aktivacije komplementnega sistema pri diabetični nefropatiji.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2012

Pregl. 6: Rezultati preiskav komplementnega sistema pri kontrolni skupini zdravih posameznikov

	<b>CH50 (%)</b>	<b>APH50 (E)</b>	<b>C3 (mg/l)</b>	<b>C4 (mg/l)</b>	<b>C3d (mU/l)</b>	<b>C4d (mg/l)</b>	<b>C4d urin (µg/l)</b>	<b>SC5b-9 plazma (mg/l)</b>	<b>SC5b-9 urin(ug/l)</b>	<b>MBL (µg/l)</b>	<b>Genotip MBL-2</b>	<b>PYRO analiza</b>	<b>Alel</b>
	(72-128)	(80-120)	(970-1576)	(162-385)	(35-70)	(0,7 – 6,3 mg/l)		(300-350)	min < 30ug/l				
<b>1</b>	136	203	1200	279	50	2,94	2,0	277	< 10ug/l	552	A0	G35A homozigot	Alel C
<b>2</b>	152	124	1280	242	48	2,31	3,0	244	< 10ug/l	524	A0	G26A heterozigot	Alel B
<b>3</b>	139	120	1370	229	60	2,03	3,0	245	< 10ug/l	847	AA	WT homozigot	Alel A
<b>4</b>	122	107	1000	171	52	6,16	3,0	250	< 10ug/l	460	AA	WT homozigot	Alel A
<b>5</b>	147	120	1410	183	54	2,87	5,0	267	< 10ug/l	171	A0	G35A heterozigot	Alel C
<b>6</b>	96	127	1330	242	54	5,18	4,0	225	< 10ug/l	1302	AA	WT homozigot	Alel A
<b>7</b>	137	145	1330	319	56	6,72	2,0	258	< 10ug/l	573	A0	G35A homozigot	Alel C
<b>8</b>	160	87	1000	183	48	1,54	2,0	< min	< 10ug/l	846	AA	WT homozigot	Alel A
<b>9</b>	148	130	1410	229	48	7,42	2,0	236	< 10ug/l	1460	AA	WT homozigot	Alel A
<b>10</b>	141	133	1200	374	52	10,7	5,0	253	< 10ug/l	148	A0	G35A homozigot	Alel C
<b>11</b>	149	104	1200	131	52	1,54	5,0	< min	< 10ug/l	332	AA	WT homozigot	Alel A

Se nadaljuje

Zorin A. Vloga aktivacije komplementnega sistema pri diabetični nefropatiji.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2012

Nadaljevanje: Pregl. 4: Rezultati preiskav komplementnega sistema pri kontrolni skupini zdravih posameznikov

<b>12</b>	100	105	1000	131	44	1,89	6,0	300	< 10ug/l	1313	AA	WT homozigot	Alel A
<b>13</b>	248	96	1410	242	44	7,28	3,0	279	< 10ug/l	591	AA	WT homozigot	Alel A
<b>15</b>	114	87	1330	332	60	12,7	4,0	330	< 10ug/l	819	A0	G26A heterozigot	Alel B
<b>16</b>	133	84	925	183	60	15,6	3,0	538	< 10ug/l	1185	A0	C19T homozigot	Alel D
<b>17</b>	75	88	1080	306	46	4,90	3,0	330	< 10ug/l	757	A0	C19T homozigot	Alel D
<b>18</b>	136	109	1080	306	50	9,24	3,0	358	< 10ug/l	389	A0	C19T homozigot	Alel D
<b>19</b>	150	84	1000	206	52	7,63	4,0	382	< 10ug/l	732	AA	WT homozigot	Alel A
<b>20</b>	102	92	963	279	46	3,92	5,0	238	< 10ug/l	559	AA	WT homozigot	Alel A
<b>21</b>	123	129	1120	306	58	11,5	6,0	341	< 10ug/l	698	AA	WT homozigot	Alel A
<b>22</b>	123	90	888	183	50	7,07	4,0	296	< 10ug/l	78	A0	G26A heterozigot	Alel B

Pri kontrolni skupini smo opravili teste za aktivacijo komplementa po klasični in alternativni poti. Izmerili smo plazemsko koncentracijo MBL, C3, C4, C3d, C4d in C5b-9 in koncentracijo C4d in SC5b-9 v urinu. Rezultati kontrolne skupine so na prvi pogled brez posebnosti. Vsi, razen enega primera (ID 13; CH50 = 248%), so znotraj normalnih mej za zdrave osebe. Značilne razlike pa so se pokazale po primerjavi statistike vzorcev, ki so bili zamrznjeni na dan odvzema krvi (vzorci z zaporednimi številkami od 1 do 11) in tistimi, ki so bili zamrznjeni po treh dneh (vzorci z zaporednimi številkami od 12 do 22). V statistično analizo sem vključili mediano, srednjo vrednost, maksimalno in minimalno vrednost, standardno deviacijo in frekvenčne histograme z normalno krivuljo (Priloga A).

Pregl. 7: Statistične vrednosti opravljenih testov se razlikujejo glede na pretečen čas med odvzemom in zamrznitvijo vzorcev. Vzorci pridobljeni 14.5. so bili 4 dni v hladilniku (+4 °C). Vzorci pridobljeni 17.5. so bili zamrznjeni isti dan

	PLAZME							
	odvzeto 14.5.2011				odvzeto 17.5.2011			
	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
<b>CH50 (%)</b>	130	46	75	248	139	17	96	160
<b>APH50 (E)</b>	96	14	84	129	127	29	87	203
<b>C3 (mg/l)</b>	1080	170	888	1410	1248	146	1000	1410
<b>C4 (mg/l)</b>	247	68	131	332	235	70	131	374
<b>C3d mu/l)</b>	51	6	44	60	52	4	48	60
<b>C4d (mg/l)</b>	8	49	2	16	4	3	2	11
<b>SC5b_9 (mg/l)</b>	339	81	238	538	251	16	225	277
<b>MBL (µg/l)</b>	712	357	78	1313	656	425	148	1460

V razpredelnici 4 so izpisane razlike v srednjih vrednostih in standardnih deviacijah pri vzorcih grupiranih glede na čas, ki je pretekel od odvzema do zamrzovanja. Standardne deviacije so večinoma manjše, srednje vrednosti pa večje pri vzorcih, ki so bili zamrznjeni isti dan.

Ob pregledu histogramov z normalno krivuljo (Priloga A) smo ocenili, da so nekatere vrednosti tudi statistično različne. Neodvisni t-test je pokazal statistično značilno razliko med skupinama vzorcev pri štirih testih. Rezultati so zaradi boljše preglednosti nanizani v razpredelnici 5.

Pregl. 8: Vrednosti statistično značilnih razlik med vzorci zamrznjenimi isti dan in štiri dni po odvzemu vzorca krvi

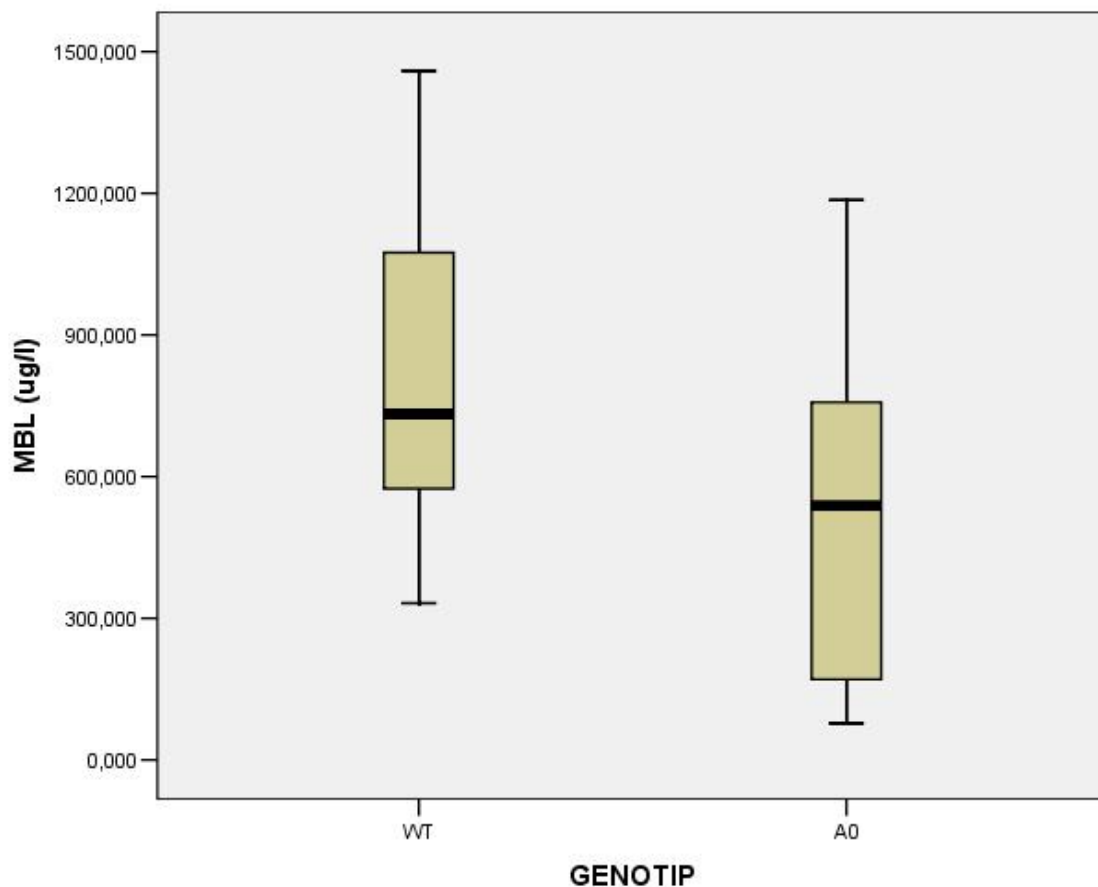
	VZORCI ZAMRZNJENI PO ŠTIRIH DNEH	VZORCI ZAMRZNJENI NA DAN ODVZEMA	
APH	96 +/- 14	127 +/- 30	t(19) = 0,561 P = 0,008
C3	1080 +/- 170	1248 +/- 146	t(17,9) = 2,43 P = 0,026
C4d	8 +/- 4	4 +/- 3	t(19) = -2,3 P = 0,031
SC5b-9	339 +/- 81	251 +/- 16	t(17) = -3,2 P = 0,005

Vzorci urina kontrolne skupine smo odvzeli 17.5.2011 in 18.5.2011. Obe skupini vzorcev smo razporedili v dve fioli za vsak vzorec in jih zamrznili na dan odvzema. Na urinu smo izvedli test za prisotnost C4d in SC5b-9. Vse vrednosti za SC5b-9 so pod 10 µg/l kar je pod minimalno vrednostjo detekcije (30 µg/l). Primerjava rezultatov urina pridobljenega 17.5. in 18.5. ne kaže nobenih statistično pomembnih razlik.

Z zbranimi podatki smo pokazali na pomembnost hitre obdelave vzorcev. Že nekaj dni hrambe v hladilniku, je pomembno spremenilo končne rezultate. Pomemben napotek za odvzem vzorcev za analizo komplementa je torej hitra obdelava.

Pri pregledu rezultatov testa za koncentracijo MBL vidimo, da kontrolna skupina ni homogena. Od skupno 21 testiranih je 11 posameznikov homozigotov za divji tip gena MBL-2. Od teh imata primer 4 in primer 11 nižjo koncentracijo od pričakovane. To bi lahko pojasnili z genotipom v promoterski regiji, ki je nismo določali. Rezultati preiskav komplementa ne kažejo, da bi pri teh dveh primerih potekalo kakšno vnetje, ki bi vplivalo na rezultate. Preostali so heterozigoti za gen MBL-2. Z analizo Pyro smo potrdili uvrstitev v mutiran alel ali alel divjega tipa. Lahko pa smo jih tudi razvrstili v tri skupine glede na mesto mutacije. Tisti z mutacijo v alelu D imajo normalno koncentracijo proteina MBL.





Sl. 6: Plazemske koncentracije MBL pri kontrolni skupini v odvisnosti od genotipa MBL-2.

## 5.2 ZNAČILNOSTI BOLNIKOV

Iz Kliničnega oddelka za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana smo pridobil vzorce urina in plazme sedmih bolnikov. Z vidika diabetologov je to homogena skupina s kronično ledvično boleznijo. Ta je lahko pogojena s sladkorno boleznijo ali pa je kronična ledvična bolezen druge vrste. Slovenske smernice za zdravstveno oskrbo bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2 določajo več pogojev, po katerih presojava, da je prisotna diabetična ledvična bolezen. Nedvoumno pa je ne moremo določiti. Vzorce krvi in urina ID 15000, 15001 in 15003 smo pridobili 19.7.2011. Vzorce krvi smo isti dan centrifugirali, tako da smo pridobili plazmo in jih zamrznili. Isti dan smo zamrznili tudi vzorce urina. Ostale vzorce ID 15002, 15004, 15005 in 15010 smo pridobili 26.7.2011. Enako kot za prejšnjo skupino smo isti dan pripravili plazmo in jo zamrznili. Vzorec 15010 je kazal znake hemolize.

Zorin A. Vloga aktivacije komplementnega sistema pri diabetični nefropatiji.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2012

Pregl. 9: Rezultati preiskav komplementnega sistema pri bolnikih (ID) z diabetično nefropatijo. Po pričakovanju imajo vsi pacienti visoke vrednosti MBL v plazmi.

Vrednosti SC5b-9 v urinu so nepričakovano nizke

ID	CH50 (%)	APH50 (E)	C3 (mg/l)	C4 (mg/l)	C3d (mU/l)	C4d plazma (mg/l)	C4d urin (µg/l)	SC5b-9 plazma (mg/l)	SC5b-9 urin (ug/l)	MBL (µg/l)	MBL-2 genotip	s-kreatinin (µmol/L)	Proteinurija (g/24h)
	(72-128)	(80-120)	(970-1576)	(162-385)	(35-70)	(0,7 – 6,3 ug/ml)		(300-350)	min < 30ug/l				
<b>15000</b>	64	99	817	254	68	5,42	8,0	<min	<min	1598	AA	227	0,995
<b>15001</b>	91	7	1330	332	>max	10,85	>max	>max	2107	554	AA	279	4,309
<b>15003</b>	93	148	1280	332	>max	3,57	75,0	100	<min	1353	AA	193	3,117
<b>15002</b>	51	6	1550	433	74	>max	>max	77	<min	1314	AA	125	3,545
<b>15004</b>	7	18	1410	360	52	>max	185,0	106	<min	1003	AA	236	1,84
<b>15005</b>	73	15	1080	206	48	10,01	45,0	172	<min	1769	AA	320	1,833
<b>15010</b>	13	135	1280	496	50	>max	51,0	83	<min	900	AA	152	2,693

Rezultati preiskav komplementa so presenetljivi. V nasprotju z našim pričakovanji večina kaže močno aktivacijo klasične ali alternativne poti komplementnega sistema, ki dokazano nima vloge pri nastanku diabetične nefropatije. Prisotnost SC5b-9 v urinu se je potrdila samo pri enem primeru (15001), ta ima normalno aktivacijo klasične in alternativne poti.

Iz zgoraj omenjenih razlogov o določanju diabetične ledvične bolezni na našem vzorcu ne moremo potrditi ali zavreči vloge MBL pri nastanku bolezni. Prav tako pa lahko dvomimo v raziskave narejene na večjih vzorcih, ki zavračajo vlogo MBL pri nastanku diabetične ledvične bolezni.

Pregl. 10 : Statistične vrednosti opravljenih preiskav komplementnega sistema pri bolnikih z diabetično nefropatijo

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
CH50 (%)	7	100	68	32
APH50 (E)	6	148	56	58
C3 (mg/l)	817	1550	1250	238
C4 (mg/l)	206	496	345	99
C3d (mu/l)	48	74	58	12
C4d (mg/l)	4	11	7	4
C4d_urin (µg/l)	8	185	73	67
SC5b_9 (µg/l)	77	172	108	38
SC5b_9_urin (µg/l)	2107	2107	2107	.
MBL (µg/l)	554	1769	1213	421

### 5.3 GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA POSAMEZNIH NUKLEOTIDOV

Genotipizirali smo tri SNP-je v eksonu 1 gena *mbl-2*. Pri HRM analizi smo tri *mbl-2* variante združili skupaj in jih imenovali alel 0. Kombinacija treh alelov divjega tipa se imenuje alel A. Analizirali smo 28 vzorcev, 7 bolnikov in 21 kontrolnih, in določili 2 različna genotipa, AA in A0. 18 vzorcev ima genotip AA oziroma divji tip homozigot, to je 64,3 % testiranih vzorcev. 10 vzorcev ima genotip A0. Pri slednjih smo s pyro analizo določili še mutiran kodon. Med njimi so trije G26A heterozigoti na kodonu 54 (alel B), trije C19T homozigoti na kodonu 52 (alel D), G35A heterozigot in trije G35A homozigoti na kodonu 57 (alel C). Ti vzorci skupaj predstavljajo 35,7 % testiranih. Genotipa 00 nismo določili pri nobenem vzorcu. Vseh sedem vzorcev bolnikov zajetih v raziskavi je homozigotov za divji tip gena MBL-2.

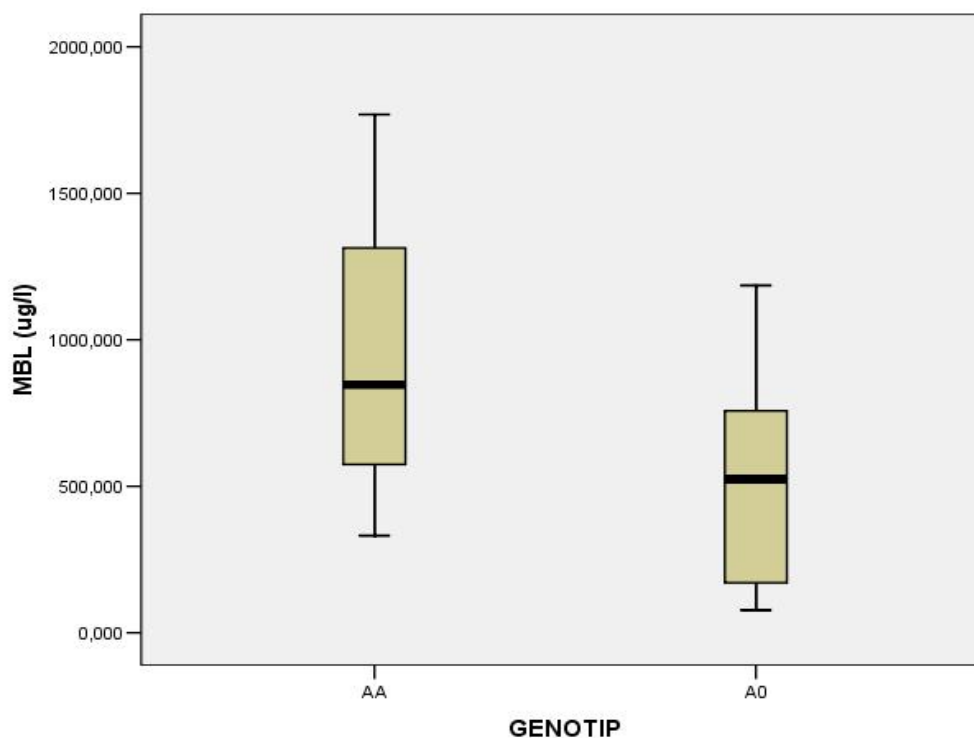
#### 5.4 ANALIZA ASOCIACIJE MED SNP IN PLAZEMSKO KONCENTRACIJO MBL

Kot smo pričakovali, so bile plazemske koncentracije pri posameznikih z genotipom AA višje kot pri posameznikih z genotipom A0. Vrednosti MBL za genotip AA so 956,94 +/- 97,59 ng/ml, za A0 516,08 +/- 121,58 ng/ml.

Pregl. 11: Statistične vrednosti MBL (ng/ml) glede na genotip *mbl-2* gena. Prikazane so vrednosti za celotno populacijo preiskovancev, kontrolna skupina in bolniki.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
AA	19	957	425	98	752	1162	332	1769
A0	9	516	365	122	236	796	78	1185
Total	28	815	452	85	640	990	78	1769

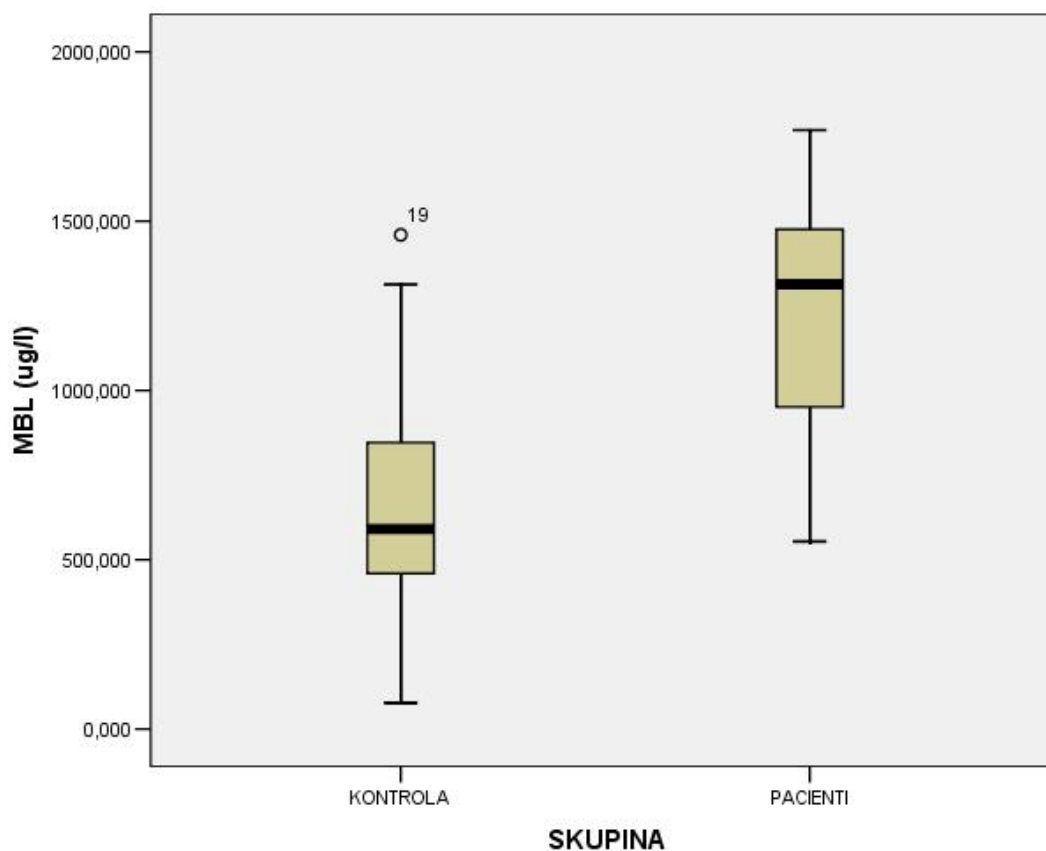
ANOVA test je pokazal statistično značilnost razlik v koncentraciji MBL med genotipoma AA in A0 za vse testirane vzorce,  $F(1,26) = 7,141$ ,  $P = 0,013$ .



Sl. 7: Plazemske koncentracije MBL v celotni testirani populaciji v odvisnosti od genotipa *mbl-2*.

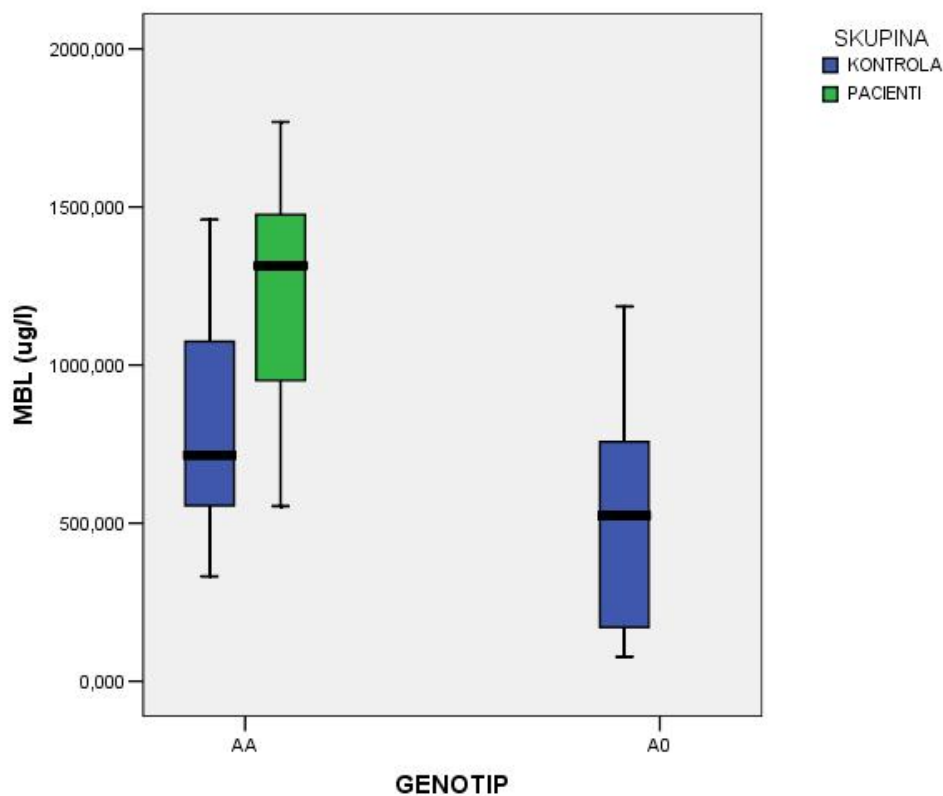
### 5.5 ANALIZA ASOCIACIJE MED PLAZEMSKO KONCENTRACIJO MBL IN NEFROPATIJO

Mediana plazemske koncentracije MBL je bila višja pri posameznikih z nefropatijo (1213.057+/- 159.19 ng/ml). Pri kontrolni skupini (682.63+/- 84.056 ng/ml). Vrednosti se statistično značilno razlikujeta,  $F(1,26) = 9.525$ ,  $P = 0.005$ .



Sl. 8: Distribucija plazemskih koncentracij MBL v kontrolni skupini sestavljeni iz zdravih posameznikov (SKUPINA KONTROLA) in pri pacientih z diabetično nefropatijo (SKUPINA PACIENTI).

Če testirane posameznike stratificiramo glede na prisotnost nefropatije in genotip *mbl-2* vidimo, da imajo vsi bolniki povišano koncentracijo MBL in spadajo v WT (AA) genotip. Pacienti imajo nasproti posameznikom iz kontrolne skupine še bistveno višje plazemske koncentracije MBL. Vzrok za razliko je lahko število vzorcev v skupini pacientov (N=7) ali pa povečana ekspresija zaradi porabe MBL v vnetnem procesu.



Sl. 9: Distribucija plazemskih koncentracij MBL v kontrolni skupini sestavljeni iz zdravih posameznikov (SKUPINA KONTROLA, MODRA BARVA) in pri pacientih z diabetično nefropatijo (SKUPINA PACIENTI, ZELENA BARVA), razporejeni v dve gruči glede na genotip MBL-2.

## 6 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 6.1 RAZPRAVA

Vloga komplementa pri poškodbah ledvic je znana. Aktivacija komplementa po klasični in alternativni poti sta vsaj deloma odgovorni za poškodbe na ledvicah pri membranskem glomerulonefritisu (Kotnik *in sod.*, 2003). Ista skupina je v sorodni raziskavi ugotovila prisotnost MAC v urinu diabetikov z razvito kronično ledvično boleznijo (neobjavljeni podatki). MAC je bil v visokih koncentracijah prisoten pri sedmih od petnajstih testiranih pacientov. Če upoštevamo samo paciente s proteinurijo večjo od 3 g/24h, je delež še večji. Kar štirje od šestih imajo močno povišano koncentracijo SC5b-9 v urinu.

Klinične študije so že nakazale vlogo MBL pri kronični ledvični bolezni (Hovind *in sod.*, 2005). Pozitivna korelacija med koncentracijo glukoze in manoze pri IDDM in NIDM in možnost aktivacije komplementa po lektinski poti s fruktozami (Fortpied *in sod.*, 2010) nakazujeta možno povezavo med diabetično ledvično boleznijo in MBL. Gen *mbl-2* se pojavlja v populaciji v dveh oblikah. Mutirana oblika (0) se izraža kot zmanjšana koncentracija proteina MBL. Sladkorni bolniki z diabetično ledvično boleznijo so po naši hipotezi nosilci AA genotipa gena *MBL-2*, ki je povezan z normalno funkcionalnostjo in normalno koncentracijo MBL v obtoku.

Preiskave sestavine MBL in analiza SNP-jev gena *mbl-2* nam je pokazala, da mutacije v eksonu1, vplivajo na količino MBL v obtoku. Koncentracije MBL v krvi so med genotipoma AA (WT) in A0 značilno različne. Iz pregleda podatkov ugotovimo tudi, da so tudi znotraj posameznega genotipa velike razlike v koncentraciji MBL. Te razlike bi se verjetno zmanjšale, če bi določali tudi genotip v promoterski regiji. Potrjeno je namreč, da na koncentracijo MBL vplivajo štirje genotipi, ki jih določimo z identifikacijo šestih različnih SNP-jev. Trije v promoterski regiji, ki jih mi nismo določali in trije v eksonu 1. Za pravilno identifikacijo genotipov je potrebno izvesti Pyro analizo. S to tehniko natančno določimo mesto mutacije in zamenjano nukleinsko kislino. Tako natančno določimo mutiran alel in ugotovimo ali po znanih podatkih vpliva na količino MBL. HRM metoda za to ne zadošča.

Rezultati analize gena *MBL-2* pri bolnikih so potrdile našo hipotezo. Vsi bolniki so imeli gen divjega tipa, ki je povezan z normalno koncentracijo MBL.

Rezultati preiskav komponent komplementa pri bolnikih niso potrdili naših domnev. Odsotnost terminalnega kompleksa iz urina in močna aktivacija klasične in alternativne poti komplementnega sistema nakazujeta, da vsaj pri nekaterih bolnikih poteka močan vnetni proces. Pričakovali bi torej, da se SC5b-9 v pojavlja v plazmi v povečani količini. Da ni tako, je morda povezano z generaliziranim odlaganjem kompleksov po vsem telesu. Ker je zato odlaganja v ledvicah relativno malo, se kljub ledvični okvari terminalni kompleksi v urinu skoraj ne pojavljajo. Ker imajo sladkorni bolniki poleg osnovne bolezni še druge, je lahko okvara ledvic posledica takšne bolezni. Ker ta nima za vzrok nastanek terminalnih kompleksov, le teh torej v urinu ne najdemo. Klinična SI. testiranih bolnikov sicer ni homogena. Trije bolniki imajo razvito proteinurijo, to je več kot 3 g/dan. Med njimi je tudi bolnik, pri katerem smo ugotovili prisotnost SC5b-9 v urinu. Preostali imajo proteinurijo manjšo od 2 g/24 h. Lahko domnevamo, da vsi nimajo z diabetesom pogojene ledvične bolezni, temveč imajo kronično ledvično bolezen druge vrste. Možno je še, da poškodba ledvič še ni v fazi, ko bi terminalne komplekse našli v urinu. Kljub temu, da je dokazana depozicija terminalnih kompleksov na ledvičnih biopsijah umrlih bolnikov z diabetično nefropatijo (Uesugi *in sod.*, 2004), to še ne zagotavlja da so ti resnično učinkoviti. Dokazano je namreč, da odlaganje terminalnih kompleksov lahko vodi k sproščanju rastnih faktorjev in citokinov brez učinka na viabilnost celice. (Benzaquen *in sod.*, 1994). Takšna celica še lahko odstranjuje terminalne komplekse iz membrane in jih razgradi.

Predvidevamo, da je obširnejša finska raziskava (Kaunisto, 2009), ki zanika vlogo MBL pri diabetični nefropatiji, imela med svojimi preiskovanci paciente obeh vrst.

Glede na zbrane podatke ne moremo sklepati, da ima MBL vlogo pri razvoju ledvične bolezni pogojene z diabetesom. Vsi pacienti so nosilci divjega tipa gena *mbl-2* vendar terminalnih kompleksov v urinu nismo našli, razen pri enem primeru. V nadaljevanju bi bilo potrebno v raziskavo vključiti tudi sladkorne bolnike, ki kljub dolgotrajni bolezni niso razvili ledvične bolezni ali pa imajo kronično ledvično bolezen druge vrste. Pri teh bi preverili še hipotezo, da so ti nosilci mutiranega tipa gena MBL-2. Lhotta in sodelavci so v raziskavi iz leta 1999 dokazali prisotnost MBL v vzorcih ledvičnih biopsij pri pacientih z glomerulonefritisom. Prisotnost MBL\*MASP kompleksov v ledvičnih biopsijah bolnikov s



potrjeno diabetično ledvično boleznijo bi lahko potrdila vlogo aktivacije komplementa po lektinski poti pri tem nevarnem zapletu.

Zaenkrat ne moremo potrditi, ali je možno s preprostim testom ugotoviti nagnjenost k okvari ledvic pogojeni z diabetesom. Za določanje genotipov *mbl-2*, ki jih povezujemo z znižano koncentracijo MBL, je potrebno vključiti še tri alele iz promoterske regije. Smiselno bi bilo meriti tudi aktivnost proteina MBL.

V naši raziskavi smo opazili tudi pomem takojšnje obdelave vzorcev za preiskave komplementa. Del vzorcev je bil zamrznjen takoj, del pa smo štiri dni hranili v hladilniku. Pomembne razlike v rezultatih so se pojavile pri testih za APH50, C3, C4d in SC5b-9. Vse sestavine komplementnega sistema so podvržene spontani aktivaciji in spontanemu razpadu, ki sestavlja tudi del kontrole sistema. Pri preiskavah je torej nujna hitrost obdelave ali pa je potrebno vzorce zamrzniti na dan odvzema.

## 6.2 SKLEPI

Opravljena raziskava v obsegu, ki smo jo izvedli ne more jasno potrditi vloge komplementnega sistema pri nastanku diabetične nefropatije kljub temu, da smo pri tretjini preiskovancev našli povečano količino SC5b-9 v urinu.

Rezultati opravljenih testov za dokaz povezave med količino proteina MBL in genotipom MBL opravičujejo domnevo, da je pri bolnikih z diabetično nefropatijo količina MBL zadostna, da bi lahko prišlo do aktivacije mananske poti in s tem nastaneka poškodb zaradi nalaganja C5b-9 v ledvičnem tkivu in posledične okvare ledvične dejavnosti z nastankom nefropatije. Pri tem smo opazili, da je pri preiskanih bolnikih s sladkorno boleznijo in klinično potrjeno nefropatijo količina SC5b-9 v plazmi pomembno manjša kot pri zdravih preiskovancih. To lahko kaže na generalizirano odlaganje kompleksov po vsem telesu in ne samo v ledvicah, kot je to značilno za nekatere druge nefropatije – npr. membranski glomerulonefritis in posledično majhno izločanje SC5b-9 v urinu.

S predloženim delom hipoteze o nastanku diabetične nefropatije zaradi dejavnosti lektinske poti ne moremo ne potrditi ne zavrnti.

V predloženem delu smo razvili metodologijo za proučevanje vloge komplementnega sistema pri nastanku diabetične nefropatije.

## 7 VIRI

- Banič B. 2006. Aktivnost lektinske poti aktivacije komplementnega sistema pri bolnikih po presaditvi ledvice: diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 54 str.
- Bilgin M. Y, Brand A., Berger P. S. 2008. Mannose-binding lectin is involved in multiple organ dysfunction syndrome after cardiac surgery: effects of blood transfusions. *Transfusion*, 48: 601-608
- Benzaquen LR, Nicholson-Weller A, Halperin J. A. 1994. Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. *Journal of Experimental Medicine*, 179: 985-992
- Corbett Research. 2006. HRM Assay Design and Analysis, CorProtocol 6000: 27 str.
- Elja P. 1996. Mannose, mannitol, fructose and 1,5-anhydroglucitol concentrations measured by gas chromatography/mass spectrometry in blood plasma of diabetic patients. *Clinica Chimica Acta*, 251: 91-103
- Ravichandran R., Vannucci S. J., Shi Du Yan S., Herold K., Fang Yang S., Schmidt A. M. 2005. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration and inflammation. *Glycobiology*, 15: 16-28
- Fortpiet J., Vertommen D., Van Schaftingen E.. 2010. Binding of mannose-binding lectin to fructosamines: a potential link between hyperglycaemia and complement activation in diabetes. *Diabetes Metabolism Research and Review*, 26: 254-260
- Hisano S., Matsushita M., Fujita T., Iwasaki H. 2005. Activation of the Lectin Complement Pathway in Henoch-Schönlein Purpura Nephritis. *American Journal of Kidney Diseases*, 45: 295-302
- Hovind P., Hansen K. T., Tarnow L., Thiel S., Steffensen R., Flyvbjerg A., Parving H. H. 2005. Mannose-Binding Lectin as Predictor of Microalbuminuria in Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 54: 1523-1527

- Kaunisto A. M., Sjöling L., Sallinen R., Pettersson-Ferholm K., Saraheimo M., Frojdo S., Forsblom C., Fagerudd K., Hansen T. K., Flyvbjerg A., Wessman M., Grop P. H. 2009. Elevated MBL Concentrations Are Not an Indication of Association Between the MBL-2 Gene and Type 1 Diabetes or Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, 57: 1710-1714
- Ken S., Kazuki N. 2010. Hypoxic regulation of glycosylation via the N-acetylglucosamine cycle. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 48, 1: 20 - 25
- Koselj M. 1999. Sladkorna bolezen tipa 2: priročnik za zdravnike. Ljubljana, samozaložba: 204 str.
- Kotnik V., Kirschfink M. 1995. Kako spoznati motenje v delovanju komplementnega sistema. *Zdravniški vestnik*, 64, 6: 335-343
- Kotnik V., Kotnik A., Malovrh T., Škoberne M., Kirschfink M. 2001. Complement induced apoptosis and necrosis of kidney cells contribute to the development of glomerulonephritis. V: *Programmed cell death : abstracts of papers presented at the 2001 meeting, New York, September 19. – September 23. Cold Spring Harbor Laboratory*, 14: 130
- Kotnik V., Lužnik-Bufon T., Schneider P., Kirschfink M. 1997. Molecular, genetic, and functional analysis of homozygous C8 beta-chain deficiency in two siblings. *Immunopharmacology (N. Y)*, 38: 215 - 221
- Kotnik V., Premzl A., Škoberne M., Malovrh T., Kveder R., Kaplan-Pavlovčič S., Kotnik A., Štiblar-Martinčič D. 2003. Demonstration of apoptosis-associated cleavage products of DNA, complement activation products SC5b-9 and C3d/dg, and immune complexes CIC-C3d, CIC-IgA, and CIC-IgG in the urine of patients with membranous glomerulonephritis. *Croatian Medical Journal*, 44, 6: 707 - 711
- Kotnik V., Zaletel J. 2011. Complement in diabetic nephropathy. *Molecular Immunology*, 48: 1719

- Kotnik V, Škoberne M., Kotnik A., Kirschfink M. 2003. In vivo and in vitro demonstration of complement induced apoptosis of human kidney cells. *Molecular Immunology*, 40, 2/4: 182
- Lhotta K., Würzner R., König P. 1999. Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14: 881-886
- Monnier V. M., Cerami A. 1981. Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long lived proteins. *Science*, 211, 4481: 491-493
- Morgan B. P. 1990. *Complement. Clinical Aspects and Relevance to Disease*. San Diego, Academic press: 55 str.
- Petersen S. V., Thiel S., Jensenius C. J. 2001. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Molecular Immunology*, 38: 133-149
- Premzel A., Kotnik V., 1999. Urine analysis suggests association of complement activation and apoptosis in patients with membranous glomerulo nephritis : presented at 7th European Meeting on Complement in Human Disease. *Molecular immunology*, 36: 306
- Premzl A. 1998. *Urin - vir diagnostično zanimivih imunoloških pokazateljev*. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 114 str.
- Qiagen 2009. *Type-it HRM PCR Handbook*: 24 str.
- Quidel corporation. 2009. *MicroVue C4d Odlomek Enzyme Immunoassay Kit*: 16 str.
- R&D Systems. *Quantikine Human MB*: 12 str
- Škoberne A., Lindič J., Kovač D., Andreja A., Pajek J., Kveder A., Kotnik V., Kveder R. 2009. The role of urinary C5b-9 (MAC) as a prognostic factor in major primary glomerulonephritides. *Therapeutic Apheresis in Dialysis*, 13, 3: A23
- The Binding Site Group. 2009. *Human Complement C3 & C4 NL BINDARID Radial Immunodiffusion Kit*: 22 str.

Trouw L.A., Seelen M.A., Daha M.R. 2003. Complement and renal disease. *Molecular Immunology*, 40: 125-134

Turner M.W. 2003. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular immunology*, 40: 423-429

Uesugi N, Sakata N, Nangaku M, Abe M, Horiuchi S, Hisano S, Iwasaki H. 2004. Possible mechanism for medial smooth muscle cell injury in diabetic nephropathy: glycoxidation-mediated local complement activation. *American Journal of Kidney Disease*, 44: 224–238

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 552 str.

Wautier J.L., Guillausseau P.J. 2001. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metabolism (Paris)*, 27: 535-542

## **ZAHVALA**

Prof. dr. Vladimirju Kotniku, ki mi je omogočil opravljanje diplomske naloge na Institutu za mikrobiologijo in imunologijo na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani. za nasvete pri analizi in pisanju naloge.

Jelki Markelj za nesebično pomoč pri izvajanju preiskav komplementnega sistema.

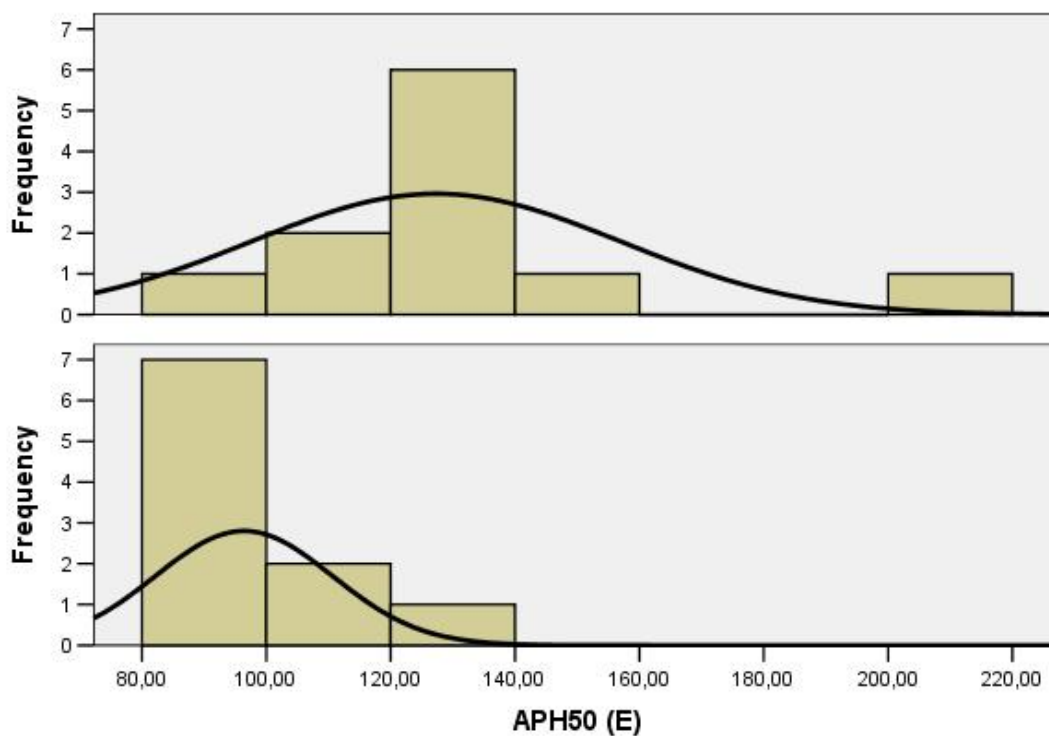
Tjaši Cerar za pomoč pri analizah DNK in interpretaciji rezultatov.

## **PRILOGA A**

Histogrami z normalnimi krivuljami za APH, C3, C4d, SC5b-9

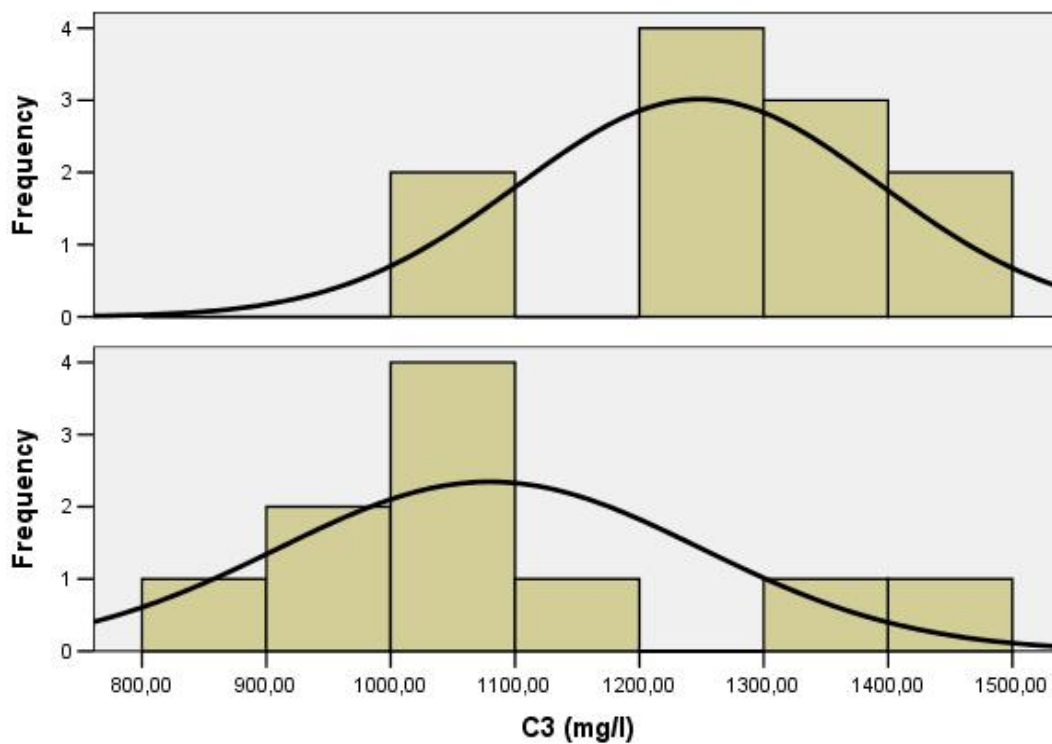


### AKTIVACIJA KOMPLEMENTA PO ALTERNATIVNI POTI



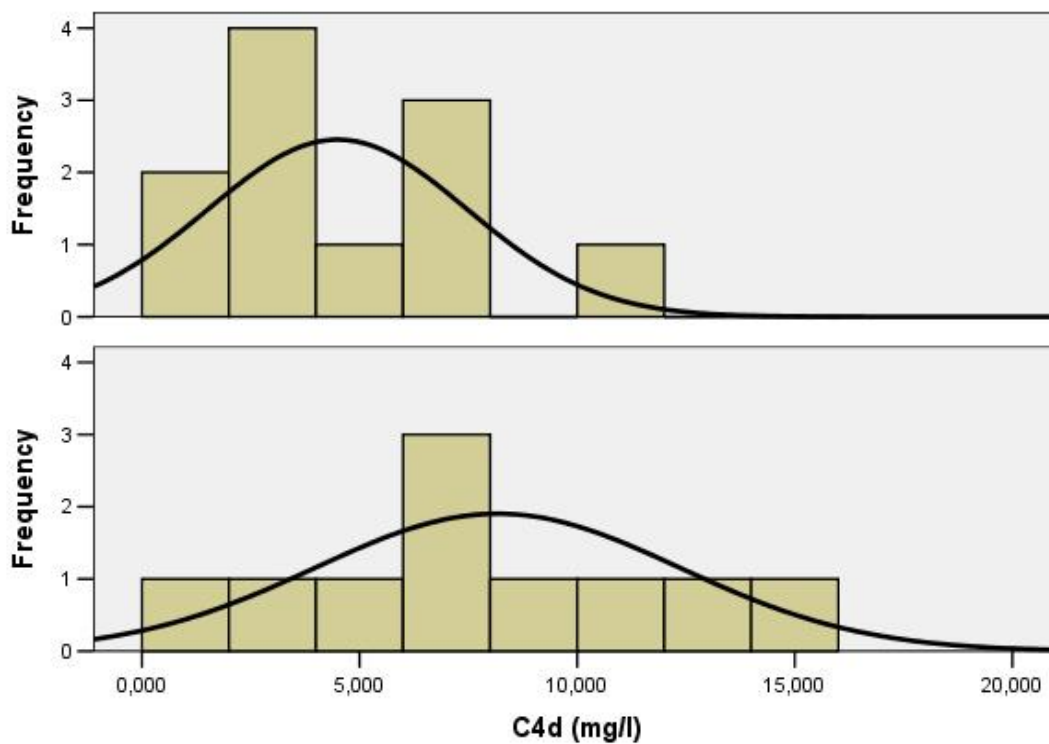
Na zgornjem histogramu so prikazani rezultati testov, ki so bili opravljeni na dan odvzema krvi. Rezultati testov plazme, ki je štiri dni stala pri +4 °C so prikazani na spodnjem histogramu.

### KONCENTRACIJE SESTAVINE C3 KOMPLEMENTNEGA SISTEMA



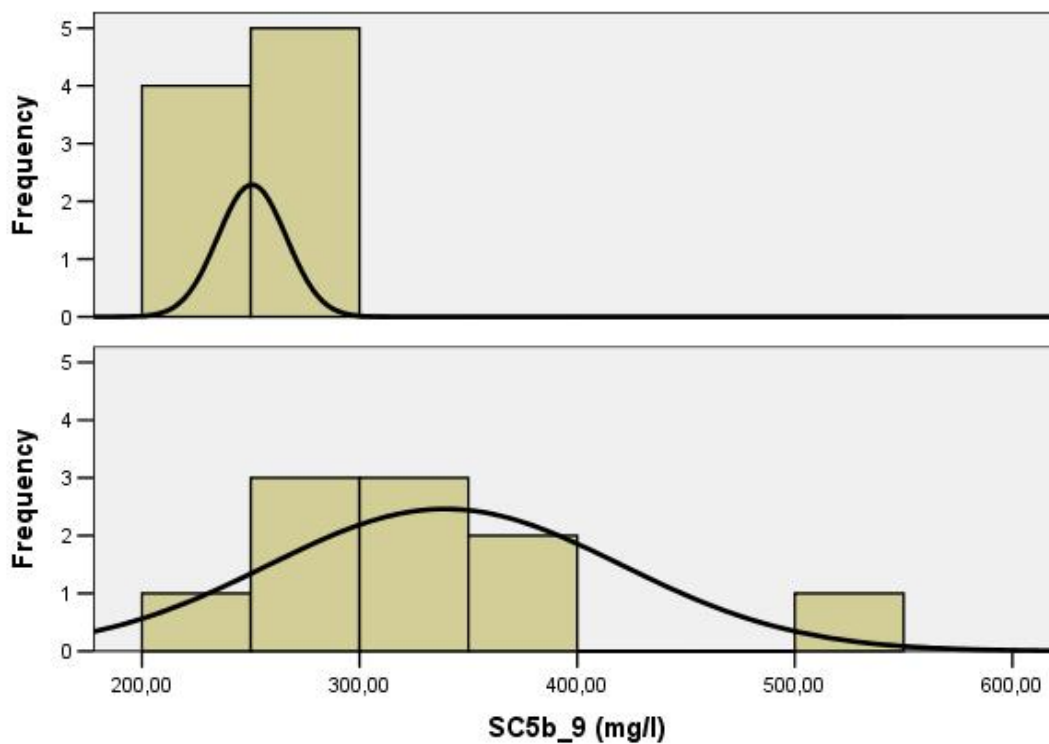
Na zgornjem histogramu so prikazani rezultati testov, ki so bili opravljeni na dan odvzema krvi. Rezultati testov plazme, ki je štiri dni stala pri +4 °C so prikazani na spodnjem histogramu.

### KONCENTRACIJA ODLOMKA C4d KOMPLEMENTNEGA SISTEMA



Na zgornjem histogramu so prikazani rezultati testov, ki so bili opravljeni na dan odvzema krvi. Rezultati testov plazme, ki je štiri dni stala pri +4 °C so prikazani na spodnjem histogramu.

### KONCENTRACIJE DELCA SC5b-9 KOMPLEMENTNEGA SISTEMA



Na zgornjem histogramu so prikazani rezultati testov, ki so bili opravljeni na dan odvzema krvi. Rezultati testov plazme, ki je štiri dni stala pri +4 °C so prikazani na spodnjem histogramu.

## **PRILOGA B**

Soglasje komisije za medicinsko etiko.