



UiT

NORGES  
ARKTISKE  
UNIVERSITET

Maria Olsen Fossmark

## Lave serumkonsentrasjoner av TGF- $\beta$ hos nord-norske pasienter med systemisk lupus erythematosus (SLE) og granulomatøs polyangiitt (GPA)

Rapport: MED-3950 masteroppgaven/Kull 2012

Tromsø: Profesjonsstudiet i medisin

Det helsevitenskapelige fakultet,

UiT Norges arktiske universitet, 2017



## Forord

Hensikten med denne studien var å undersøke om det er forskjell i serumkonsentrasjoner av cytokinene IFN- $\gamma$  og TGF- $\beta$  hos pasienter med de autoimmune sykdommene systemisk lupus erythematosus (SLE) og granulomatøs polyangiitt (GPA) sammenlignet med friske kontroller.

Arbeidsprosessen startet i det små våren 2015. Etter å ha kontaktet Gro Østli Eilertsen, revmatolog og medlem av forskningsgruppen for molekylær inflammasjon ved UiT, ble vi enige om å gjøre en studie på SLE- og GPA-pasienter med målinger av cytokinkonsentrasjoner i serum. Forskningsgruppen har et pågående prosjekt om signaleringsveier ved SLE der cytokin-kartlegging tidligere har blitt utført. Gro foreslo at jeg kunne starte med å analysere et nytt cytokin, IFN- $\gamma$  (interferon-gamma). Analysene av IFN- $\gamma$  ble gjennomført i august 2016. Dessverre fikk vi ikke utslag på kjøringene. Om dette skyldes ikke-målbare konsentrasjoner i serum, feil i ELISA-kit eller feil i metoden vites ikke. Vi kunne ikke trekke konklusjoner ut fra resultatene. Nye analyser ble gjennomført i januar 2017 av TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta), denne gangen med målbare utslag. I forkant av kjøringene søkte vi refusjon fra universitetet for utlegg til ELISA-kit og annet nødvendig laboratoriemateriell.

Bidragende til denne oppgaven er først og fremst veileder Gro Østli Eilertsen, samt overingeniør i forskningsgruppen for molekylær inflammasjon Kirsten Synnøve Nilsen. Gro er idéskaper bak studien, og har bidratt med faglige tilbakemeldinger og svar på spørsmål underveis i arbeidet. Kirsten fungerte som nøkkelperson under den praktiske gjennomføringen av laboratoriarbeidet.

Takk til Gro for god veiledning og oppmuntring. Din kliniske og forskningsmessige erfaring har vært uvurderlig i dette arbeidet. Du har gitt konstruktive tilbakemeldinger uten å kvele min nysgjerrighet eller entusiasme, tvert imot. Takk til Kirsten for flotte og lærerike dager på laboratoriet, og din tålmodighet overfor undertegnede (en skarve student uten nevneverdig lab-erfaring). ELISA-kjøringene ville nok tatt ukesvis uten deg!

Tromsø, 01.06.17

Maria Olsen Fossmark

## Innholdsfortegnelse

Forord .....	ii
Sammendrag.....	v
1 Innledning.....	1
1.1 Immunforsvaret .....	1
1.2 Cytokiner .....	2
1.3 Det adaptive immunforsvar: T- og B-lymfocytter.....	3
1.4 Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) og Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) .....	4
1.5 Komplementsystemet .....	5
1.6 Toleransebrudd kan føre til autoimmune sykdommer.....	6
1.7 Antinukleære antistoffer (ANA) og anti-nøytrofilt cytoplasmatisk antistoff (ANCA) 6	
1.8 «American College of Rheumatology» (ACR)-kriterier .....	7
1.9 Systemisk lupus erythematosus (SLE) .....	7
1.9.1 Epidemiologi .....	7
1.9.2 Kliniske manifestasjoner .....	8
1.9.3 Klassifikasjonskriterier.....	11
1.9.4 Patofysiologi.....	12
1.9.5 SLE og cytokiner.....	13
1.9.6 Medikamentell behandling ved SLE.....	13
1.10 Granulomatøs polyangiitt (GPA).....	13
1.10.1 Epidemiologi .....	14
1.10.2 Kliniske manifestasjoner .....	14
1.10.3 Klassifikasjonskriterier.....	16

1.10.4	Patofysiologi.....	16
1.10.5	GPA og cytokiner.....	16
1.10.6	Medikamentell behandling ved GPA .....	17
2	Formål .....	18
3	Materiale.....	18
4	Metode.....	19
4.1	ELISA-teknikk.....	19
4.2	Analyser på laboratoriet.....	20
4.3	Statistiske metoder.....	21
5	Resultater.....	22
5.1	Kjønns- og aldersfordeling i utvalgene .....	22
5.1.1	T-test for aldersfordeling i utvalgene .....	23
5.2	Nivå av TGF- $\beta$ (pg/mL) i serum.....	23
5.2.1	T-test for nivå av TGF- $\beta$ i utvalgene.....	24
6	Diskusjon.....	25
7	Konklusjon .....	28
8	Referanseliste .....	30
9	Vedlegg 1-5 (5 stk.): Sammendrag av kunnskapsevalueringer .....	34
10	Vedlegg 6: Ordliste immunologiske begreper .....	39
11	Vedlegg 7: Ordliste statistiske begreper.....	41
12	Vedlegg 8: Ordliste laboratorierelaterte begreper .....	43
13	Vedlegg 9: ELISA protokoll IFN-gamma.....	44
14	Vedlegg 10: ELISA protokoll TGF-beta1 .....	49
15	Vedlegg 11: Oppskrift tris-buffered saline og phosphate-buffered saline .....	53

## Sammendrag

**Innledning:** Systemisk lupus erythematosus (SLE) og granulomatøs polyangitt (GPA) er systemiske autoimmune sykdommer. Immunforsvaret tolererer vanligvis egne celler og vev, men toleransen brytes ved autoimmunitet. Ved aktivert immunforsvar vil serumkonsentrasjon av cytokiner, heriblant «transforming growth factor beta» (TGF- $\beta$ ) og «interferon gamma» (IFN- $\gamma$ ), kunne være endret. Formålet med studien var å undersøke om det er forskjell i serumkonsentrasjoner av TGF- $\beta$  og IFN- $\gamma$  hos pasienter med SLE, GPA og friske kontroller.

**Materiale og metode:** Dette er en tverrsnittstudie der vi har målt serumkonsentrasjon av IFN- $\gamma$  og TGF- $\beta$  med DuoSet ELISA Human. Ved analyse av TGF- $\beta$ 1 var det inkludert 91 pasienter med SLE, 30 pasienter med GPA og 38 friske kontroller. Ved analyse av IFN- $\gamma$  var det inkludert er 48 pasienter med SLE, 60 med GPA og 39 kontroller. Eksklusjonskriterier var pasienter med kroniske psykiske sykdommer eller alvorlige somatiske sykdommer. Datamaterialet er analysert med t-test. Statistiske analyser er gjort med SPSS v24.0.

**Resultater:** Vi fikk ingen utslag på kjøringene av IFN- $\gamma$ . Med kjøringene av TGF- $\beta$  hadde pasientene med SLE gjennomsnittlig serumkonsentrasjon på 696 pg/mL, pasientene med GPA 655 pg/mL og kontrollene 978 pg/mL. Pasientene med SLE hadde signifikant lavere verdier av TGF- $\beta$  sammenlignet med kontrollene ( $p = 0,000$ , [49,130]). Også pasientene med GPA hadde signifikant lavere verdier i forhold til kontrollene ( $p = 0,000$ , [202,442]). Det var ingen signifikant forskjell mellom pasientene med SLE og pasientene med GPA ( $p = 0,375$ , [205,358]).

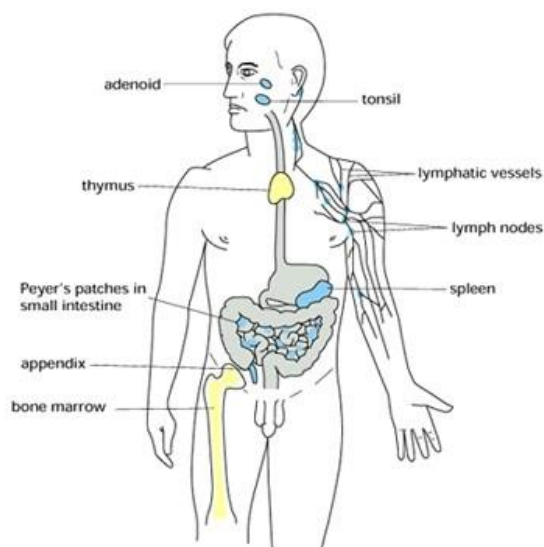
**Konklusjon:** Pasientene med SLE og GPA hadde signifikant lavere konsentrasjoner av TGF- $\beta$  i serum sammenlignet med friske kontroller. Funnene understøtter at cytokinet har en rolle ved disse autoimmune sykdommene. Ytterligere forskning behøves for kartlegging av patogene mekanismer og terapeutiske mål ved både SLE og GPA. Kanskje ville et medikament som fremmet produksjonen av TGF- $\beta$  hatt gunstig effekt ved SLE og GPA.

# 1 Innledning

I denne studien har vi målt cytokinnivåer hos to pasientgrupper med ulike autoimmune sykdommer og hos en kontrollgruppe. For å forstå relevansen av dette er det nødvendig med en grunnleggende forståelse for immunologi, autoimmunitet og de aktuelle sykdommene (SLE og GPA). De følgende avsnittene er en kort innføring i disse temaene. Alfabetisk organisert ordliste ligger vedlagt (vedlegg 7), her finnes definisjoner og beskrivelser av begreper benyttet i teksten.

## 1.1 Immunforsvaret

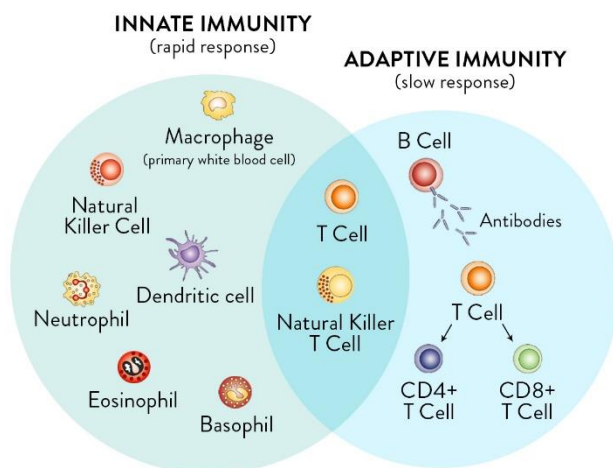
Immunforsvaret beskytter individet mot infeksjon og tumor, men det er ingen lett oppgave. For å fungere optimalt må det gjenkjenne millioner av fremmede, potensielt farlige substanser og reagere på disse, samtidig som det må unngå å angripe kroppens egne friske celler og organer. Immunforsvaret består både av spesialiserte celler, molekyler og proteiner i blodet. Mesteparten av immunforsvarets celler finnes i de lymfoide organene. Dette inkluderer beinmarg, thymus, lymfeknuter, tonsiller, milt og lymfoid vev knyttet til tarmen. Alle immunforsvarets celler blir dannet og utviklet i primært lymfoid vev, beinmarg og thymus (1, s. 19-25).



Figur 1 Lymfoide organer

Kilde: Medical Encyclopedia. Lymphoid organs. <http://medicalterms.info/anatomy/Lymphoid-Organs/> (04.04.2017)

Immuncellene inkluderer blant annet granulocytter, monocytter/makrofager og lymfocytter. Alle har særegne roller i immunresponsen. Makrofager, monocytter og granulocytter er hovedsakelig involvert i den ikke-adaptive delen av immunforsvaret. Det er medfødt og endrer seg ikke i løpet av livet. De er viktige innledningsvis ved en infeksjon ettersom de kan reagere raskt. Lymfocyttene utgjør den adaptive delen, det ervervede immunforsvar. De er nyere celletyper og deles inn i B-celler, T-celler og «Natural killer» (NK)-celler. Hovedforskjellen på lymfocytter og mer primitive immunceller er at lymfocyttene har reseptorer på overflaten som spesifikt kan gjenkjenne kroppsfremmede strukturer (antigener). Lymfocyttene har, til forskjell fra det ikke-adaptive immunforsvar, evne til antigen-spesifisitet og opprettholdelse av et immunologisk minne (2, s. 127-130). De gjennomgår en utvelgelsesprosess i beinmargen og thymus for å kunne sele ut celler som vil reagere med kroppens egne strukturer (1, s. 20-23).



Figur 2 Oversikt over immunforsvarets celler

Kilde: Rawls B. How the immune system works. Rawls MD <https://rawlsmd.com/health-articles/how-the-immune-system-works> (29.03.2017)

## 1.2 Cytokiner

«Transforming growth factor beta» (TGF- $\beta$ ) og «interferon gamma» (IFN- $\gamma$ ) er to av mange cytokiner som finnes i kroppen vår. Cytokiner er løselige signalmolekyler. Det er en omfattende gruppe, og alle celletyper produserer cytokiner i større eller mindre grad. Men det er forskjell på hvilke cytokiner den enkelte celle kan produsere og hvilke den kan reagere på.

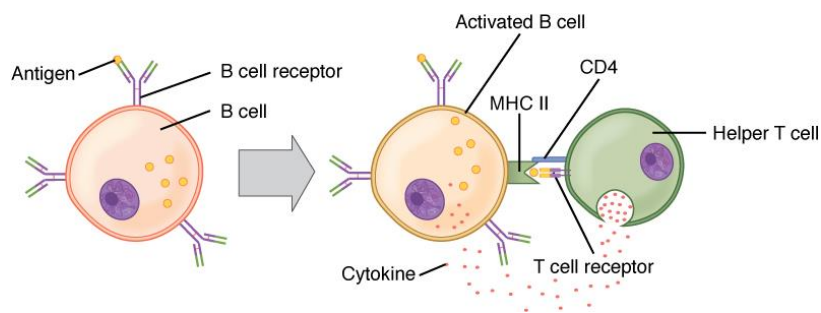
Noen cytokiner er karakteristiske for det adaptive immunforsvar, og de kan være enten proinflammatoriske eller antiinflammatoriske (3, s. 214-216). Cytokinene har som funksjon å regulere vekst, celledød, differensiering og aktivitet i både immunceller og andre målceller i kroppen. De er viktige i forhold til regulering av immunresponsen. De fleste cytokinene har lokale effekter. Deres virkning er ofte rettet mot produsentcellen selv (autokrint) eller naboceller (parakrint). De ulike cytokinene har ofte delvis overlappende effekter og påvirker hverandres aktivitet. De inngår i et nettverk hvor et enkelt cytokin kan påvirke syntesen og virkningen av andre cytokiner (1, s. 144-147). En rekke cytokiner har til nå blitt kartlagt, med sine særegne roller og funksjoner.

### 1.3 Det adaptive immunforsvar: T- og B-lymfocytter

T-cellene utvikler seg fra celler som har migrert til thymus, hvor de differensierer og modnes. De modne cellene vil på sin overflate enten uttrykke et glykoprotein kalt CD4, eller en variant kalt CD8. Hvilket molekyl de uttrykker gir grunnlaget for om de fungerer som såkalte T-hjelper-celler (CD4-positive celler) eller cytotoksiske T-celler (CD8-positive celler) (2, s. 127-129). T-hjelper-cellene skiller blant annet ut signalmolekyler (cytokiner), og cytotoksiske T-celler skiller ut stoffer som kan drepe celler eller mikroorganismer (1, 153-155). I tillegg finnes en tredje type T-celler, såkalte regulatoriske T-celler. De er også CD4-positive, men i motsetning til T-hjelpercellene virker de dempende på immunforsvaret (3, s. 152).

B-cellene modnes i beinmargen og sirkulerer i perifert blod inntil de kjenner igjen et antigen. De har tre funksjoner i immunforsvaret; de produserer antistoff, de er effektive antigenpresenterende celler og de er produsenter av en rekke cytokiner (3, s. 175). B-celler har ulike reseptorer i forskjellige stadier av sin utvikling, samt flere typer reseptorer. Men alle er membranbundne immunglobuliner, og ved aktivering kan B-cellen skille ut fritt løselig immunglobulin i form av antistoffer. Når B-cellen har blitt antistoff-produserende kalles den en plasmacelle (1, s. 61-62). Immunforsvaret er et komplekst system der ulike komponenter påvirker og er avhengige av hverandre. Man har sett at fjerning av thymus hos nyfødte medfører en betydelig svekkelse i evnen til å produsere antistoffer. Thymus er det sentrale organet for T-cellers utvikling. Og Th-celler er som regel nødvendige for at B-celler skal utvikle seg til plasmaceller og cytokin-produserende celler (3, s. 177).





Figur 3 Th-cellers aktivering av B-cellen

Kilde: BC Open Textbooks. The adaptive immune response, B-lymphocytes and antibodies.

<https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/21-4-the-adaptive-immune-response-b-lymphocytes-and-antibodies/>  
(02.04.2017)

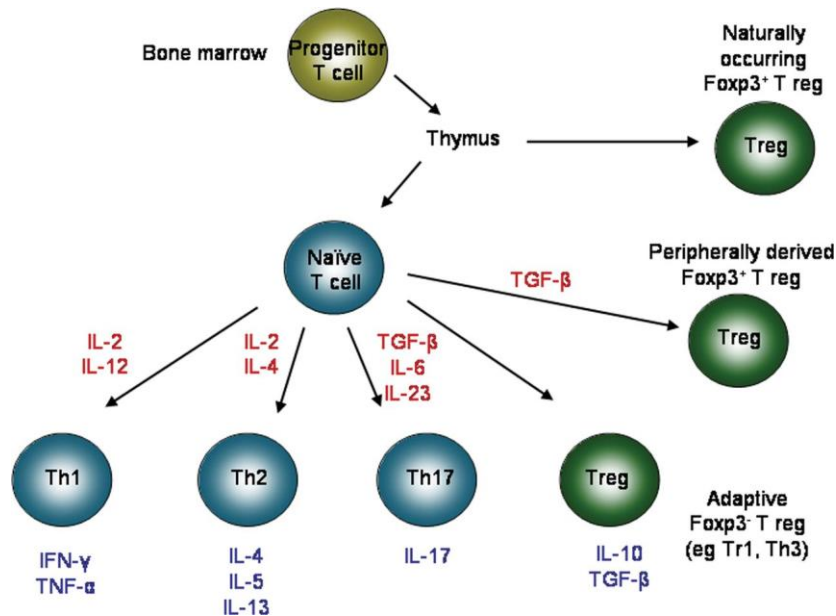
#### 1.4 Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) og Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )

Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) produseres av T-celler og NK-celler, og er et cytokin med flere effekter (3, s. 214-216). Det er tilknyttet celle-mediert immunitet, antiviral aktivitet, inflammasjon og autoimmune sykdommer. Proinflammatoriske cytokiner har vist seg å kunne bidra til patogenesen ved systemisk lupus erythematosus (SLE) og andre autoimmune sykdommer (4).

Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) produseres av T-celler og monocytter, og virker regulerende på immunforsvaret. Det er i så måte et antiinflammatorisk cytokin. Hos mennesker har TGF- $\beta$  vist seg å ha en effekt på både medfødte og adaptive funksjoner ved autoimmune sykdommer. Cytokinet påvirker immuncellenes utvikling, differensiering og evne til selv-toleranse. TGF- $\beta$  er en stor familie av proteiner med lignende funksjon og oppbygning. Hos pattedyr finnes blant annet TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 og  $\beta$ 3; tre ulike, men lignende cytokiner. Av disse har spesielt TGF- $\beta$ 1 vist seg å spille en viktig rolle for immunforsvaret med sine potente, immunregulerende egenskaper (5).

Når naive T-celler aktiveres i de lymfoide vev kan de blant annet under påvirkning av TGF- $\beta$  i det lokale cytokin-miljø utvikle seg til induserbare regulatoriske T-celler (iTreg). iTreg utøver sin hemmende virkning på andre celler via en stor produksjon av cytokinene IL-10 og TGF- $\beta$ , som virker hemmende på en rekke prosesser i immunsystemet, blant annet utvikling av Th-celler og B-cellenes antistoffproduksjon.

De regulatoriske T-cellers rolle i styringen av immunforsvaret er fortsatt ikke fullstendig kartlagt, men en svikt i systemet av regulatoriske T-celler ser ut til å være en sentral brikke i utviklingen av mange autoimmune tilstander (3, s. 152-153).



Figur 4 TGF-beta stimulering av Th17- og regulatoriske T-celler

Kilde: Mellanby RJ, Thomas DC, Lamb J. Role of regulatory T-cells in autoimmunity. Clinical science

<http://www.clinsci.org/content/116/8/639> (07.05.2017)

## 1.5 Komplementsystemet

Som del av det medfødte immunforsvaret inngår også en gruppe plasmaproteiner kalt komplement. De er et sett av proteiner som virker sammen i en viss rekkefølge for å utøve sin biologiske virkning, og regnes derfor som et kaskadesystem. Systemet har fått navnet «komplement» fordi det ble oppdaget senere enn antistoffene. Det var noe i tillegg til antistoffene som var i stand til å drepe bakterier, og «tillegget» ble kalt komplement. Komplementsystemet har evnen til å indusere kraftig immunologisk aktivitet, og ved ukontrollert aktivering vil det kunne påføre oss betydelig skade (1, s. 38-40).

## 1.6 Toleransebrudd kan føre til autoimmune sykdommer

Immunforsvaret tolererer normalt sett egne celler og vev, men angriper fremmede antigener.

Endringer i ulike sjekkpunkter for selv-toleranse kan oppstå på bakgrunn av genetiske, epigenetiske, molekylære, cellulære og miljømessige faktorer. Det kan resultere i et toleransebrudd i immunsystemet og der plasmaceller produserer autoantistoffer som igjen kan angripe kroppsegne celler og vev. Det kalles autoimmunitet, og kan manifesterer seg i inflammatoriske responser i vev, drevet både av det medfødte immunforsvar, autoantigen-spesifikke B -og T-celler samt cytokiner (6). Kronisk inflammasjon kan føre til organskade. De systemiske autoimmune sykdommer i bevegelsesapparatet (ledd, skjelett og muskler) og i bindevevet er inkludert i fagområdet revmatologi (7, s. 11).

## 1.7 Antinukleære antistoffer (ANA) og anti-nøytrofilt cytoplasmatisk antistoff (ANCA)

Immunologiske forstyrrelser er karakteristisk for autoimmune sykdommer. Påvisning av autoantistoffer i serum har derfor en sentral plass i diagnostikken av disse sykdommene.

Antinukleære antistoffer (ANA) er rettet mot strukturer i cellekjernen, og er en form for autoantistoffer. En positiv test for ANA forteller oss at pasienten har utviklet antistoff mot komponenter i egne cellekjerner. Slike autoantistoffer sees også hos mer enn 5% av den friske befolkningen, og er derfor et uspesifikt funn. Hvilke strukturer i cellekjernen antistoffet er rettet mot er i større grad sykdomsspesifikt, og underklasse av ANA vil være relevant ved diagnostikk. Ved systemisk lupus erythematosus (SLE) vil man kunne påvise flere subspesifisiteter av ANA (7, s. 18-19).

Anti-nøytrofilt cytoplasmatisk antistoff (ANCA) er autoantistoffer rettet mot spesifikke enzymer i granulocytter. De deles inn i to undergrupper, cANCA (cytoplasmatisk) og pANCA (perinukleært). Også en positiv ANCA er et uspesifikt funn, og generelt er pANCA mer uspesifikt enn cANCA. Av pasienter med cANCA vil rundt 40% ha granulomatøs polyangiitt (GPA). Dersom cANCA i tillegg utgjøres av et antistoff rettet mot Proteinase 3

(PR3) er det sannsynlig at pasienten lider av GPA. GPA omtales derfor som en ANCA-assosiert vaskulitt (7, s. 19).

## 1.8 «American College of Rheumatology» (ACR)-kriterier

«American College of Rheumatology», ACR, er en stor, amerikansk institusjon for revmatologisk forskning. Det ble grunnlagt i 1934, og har vært forgjenger for utviklingen av kriteriesett til en rekke revmatologiske sykdommer. Både SLE og GPA klassifiseres på bakgrunn av kriterier utarbeidet av «American College of Rheumatology», såkalte ACR-kriterier. Kriteriene for SLE ble revidert i 1997 (ACR97). De er mest brukt innen forskning de siste årene (8), og i 2012 kom de siste «SLICC criteria of SLE», som er mer komplekse (9). Kriteriene for GPA ble senest oppdatert i 1990 (10). Det finnes ikke egentlig diagnostiske kriterier for sykdommene, men klassifikasjonskriterier er utarbeidet. Disse kan til en viss grad benyttes i klinisk praksis, men er viktigst til bruk i vitenskapelige studier. I klinikken kan kriteriene sees i sammenheng med pasientens kliniske bilde, autoantistoffer og histologi for å fastslå diagnose (7, s. 101).

## 1.9 Systemisk lupus erythematosus (SLE)

Systemisk lupus erythematosus (SLE) er en systemisk autoimmun sykdom som kan angripe alle organer og organsystemer. Produksjonen av autoantistoffer er uttalt, der antinukleære antistoffer (ANA) påvises hos ca. 95%. ANA er derfor viktig i diagnostikken av SLE (7, s. 99-100).

### 1.9.1 Epidemiologi

En studie fra Oslo gjennomført over en 9-årsperiode fra 1999 til 2008 (Lerang og medarbeidere) viste en gjennomsnittlig årlig insidens av SLE i Norge på 3,0 pr. 100.000 innbyggere og prevalens på 52,8 pr. 100.000 innbyggere (91,0 for kvinner og 10,7 for menn). SLE er således betydelig vanligere hos kvinner. Kvinnene hadde to insidenstopper. Første topp var mellom 16-29 år, den andre mellom 50-59 år. Kvinner mellom 16-39 år hadde en signifikant høyere insidens sammenlignet med kvinner eldre enn 60 år, altså er SLE en sykdom som ofte rammer yngre kvinner med mange leveår foran seg. Menn hadde høyest

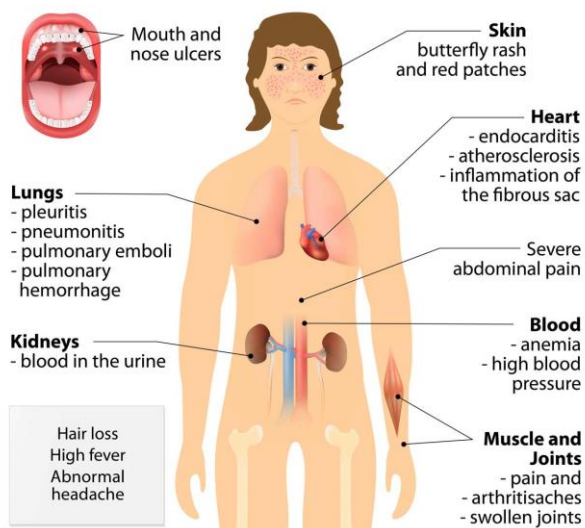
insidens mellom 50-59 år (11). Dette er sammenlignbart med en studie fra Nord-Norge med årlig insidens på 2,7/100 000, prevalens på 67/100 000 og der ca. 1/800 fertile kvinner (mellom 15-50 år) har sykdommen SLE (12).

En annen studie av Lerang og medarbeidere viste at fem -og ti års overlevelse var signifikant redusert hos SLE-pasientene sammenlignet med den øvrige befolkningen. Av alle SLE-pasientene som døde mens studien foregikk var gjennomsnittlig alder ved dødsfall 63 år, mens for de matchede kontrollene var den 77 år. Selv om de kvinnelige SLE-pasientene hadde en relativ god 10-års overlevelse (95% vs. 97% for kontrollene) døde en femtedel av SLE-pasientene før de var fylt 40 år gamle (13). En nord-norsk studie med tall fra 1978-1996 viste 5- og 10 års overlevelse på henholdsvis 92% og 75% (14).

### 1.9.2 Kliniske manifestasjoner

I utgangspunktet er alle organsystemer i kroppen potensielle mål for skade av sykdomsprosessen relatert til SLE (15). SLE omtales som en av «de store imitatorene» innen medisinen ettersom det kliniske bildet vil variere betydelig avhengig av hvilke organer som affiseres. Likevel regnes sentralnervesystemet, pleura, perikard, ledd, nyrer og hud som predileksjonssteder for affeksjon ved SLE. Inflammasjon i de ulike organene vil gi ulike sykdomsmanifestasjoner og symptomer. Ved sykdomsdebut vil noen pasienter presentere generelle symptomer i form av nedsatt allmenntilstand, feber, vekttap og leddsmerter. Andre vil debutere med for eksempel glomerulonefritt uten andre symptomer (7, s. 94-99).

## Systemic lupus erythematosus



Figur 5 Kliniske manifestasjoner av SLE.

Kilde: Medical news today. Lupus: causes, symptoms and research. <http://www.medicalnewstoday.com/info/lupus> (13.05.2017)

Affeksjon av sentralnervesystemet ved SLE kan gi både inflammasjon eller trombose og iskemi. Klinisk vil dette kunne gi seg utslag som ulike nevrologiske og psykiatriske symptomer, blant annet fokalnevrologiske utfall (pareser og epilepsi), psykiske symptomer (organisk hjernesyndrom, psykoser, fatigue, depresjon) og hodepine. Psykiske symptomer ved SLE kalles også nevropsykiatrisk SLE (16). De nevropsykiatriske manifestasjonene er relativt vanlige, og kan oppstå ofte tidlig i sykdomsforløpet. En kanadisk kohortstudie fra 2007 inkluderte pasienter fra det øyeblikket de fikk sin SLE-diagnose, og man fant at 28% av pasientene hadde hatt minst én nevropsykiatrisk hendelse ved diagnosetidspunkt. Utvikling av nevropsykiatrisk SLE er også av stor betydning for livskvaliteten til pasientgruppen (17).

Ved affeksjon av pleura er vanligste manifestasjon pleuritt med væskedannelse, med symptomer som dyspné, hoste og eventuelt smerter ved inspirasjon. En gresk studie viste at 13,6% av de mannlige pasientene og 9% av de kvinnelige pasientene hadde pleuritt ved diagnosetidspunkt, men de første fem årene etter diagnose var det mindre vanlig med pleuritt. Pleuritt er vanligere enn parenkymatøs lungesykdom (18).

Kardiovaskulær affeksjon er ikke uvanlig ved SLE, der perikarditt opptrer hyppigst. Dette kan påvises hos over halvparten av pasientene, selv om kun en fjerdedel har kliniske symptomer på perikarditt (19). Ved perikarditt kan pasienten oppleve dyspné og eventuelt brystmerter. Ved auskultasjon vil man kunne høre gnidningslyd over hjertet. Videre er hjerte-karsykdom sentral årsak til dødsrisiko og død hos pasienter med SLE; hele 30% av SLE-pasientene dør som følge av et myokardinfarkt. I tillegg har pasienter med SLE fem ganger økt risiko for myokardinfarkt i forhold til normalbefolkningen, samt at de utvikler dette ved en signifikant lavere alder (45 vs. 69 år) (20, 21).

Nesten alle pasientene opplever leddsmerter, men tenosynovitt opptrer hyppigere enn artritt (7, s. 95). Jaccoud-deformiteter, også kalt Jaccouds artropati, er en form for deformitet som sees relativt hyppig hos SLE-pasientene. Hendene affiseres hyppigst, og pasientene utvikler feilstillinger i form av sublaksasjoner i MCP-ledd, «svanehals-deformiteter» og ulnar deviasjon av fingre. Feilstillingene skyldes ikke erosjon, men kommer som følge av kronisk inflammasjon med periartikulær hevelse og fibrose sammen med slappe ligamenter og ubalansert muskulatur. De skiller seg derfor fra deformitetene som sees ved revmatoid artritt, hvor erosjon er underliggende årsak (22).



Figur 6 Jaccoud-deformitet ved SLE

Kilde: Mittermayer S, Machicado V. Jaccoud's arthropathy. The New England Journal of Medicine.

<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMicm1410743#t=article> (25.05.2017)

Selv om SLE er en sykdom assosiert med både sykdomsbyrde og dødelighet finnes stor variasjon i alvorlighetsgrad blant pasientene. Utvikling av nyresykdom i form av lupus-nefritt er av stor betydning for overlevelse.

Av alle SLE-pasienter vil 30-50% utvikle nefritt i løpet av de første 5 sykdomsår (7, s. 98). 16% av pasientene har nefritt ved diagnosetidspunkt. Flere menn og pasienter med ikke-europeisk opphav utvikler nefritt (23).

Man har observert en 10-års overlevelse på 95% ved komplett remisjon av nefritt, 76% ved partiell remisjon og 46% ved ingen remisjon. Tallene tilsier at selv en partiell remisjon ved lupus-nefritt er assosiert med en signifikant bedre pasientoverlevelse sammenlignet med ingen remisjon, der prognosene er dårlige (24).

Huden er et målorgan som affiseres av sykdommen på en rekke ulike måter. Kutane manifestasjoner kan komme til uttrykk som karakteristisk sommerfugl-eksantem, men urticaria, purpura og bullae er heller ikke uvanlig. En stor andel av pasientene opplever solømfintlighet (7, s. 97-98).

Kutane manifestasjoner utgjør derfor også 4 av de 17 SLICC-kriteriene fra 2012 for SLE; akutt kutan lupus, kronisk kutan lupus, orale ulcerasjoner og ikke-arrdannende alopecia (9).



Figur 7 Karakteristisk sommerfugl-eksantem ved SLE

Kilde: Web MD. A visual guide to understanding lupus. <http://www.webmd.com/lupus/ss/slideshow-lupus-overview> (14.05.2017)

### 1.9.3 Klassifikasjonskriterier

ACR 1997-klassifikasjonskriterier for SLE, krever 4 av følgende 11 kriterier for å være oppfylt:



- Malart utslett (erytem malart som sparer nasolabiale furer, «sommerfugl-eksantem»)
- Diskoid utslett (erytematøse forandringer, ofte med avskalling)
- Fotosensitivitet (utslett etter sol-eksponering)
- Orale ulcera (evt. nasofaryngeale)
- Artritt (non-erosiv artritt i to eller flere ledd)
- Serositt (pleuritt eller perikarditt)
- Nyresykdom (proteinuri eller sellesylindre)
- Nevrologisk sykdom (kramper eller psykose)
- Blodsykdom (hemolytisk anemi, leukopeni, lymfopeni eller trombocytopeni)
- Immunologisk forstyrrelse (anti-DNA-antistoff, anti-Sm-antistoff, eller anti-fosfolipid antistoff)
- Antinukleært antistoff (ANA) (7, s. 275, 25).

#### 1.9.4 Patofysiologi

Sykdommen utviser stor bredde både i forhold til kliniske trekk og årsaksfaktorer. I dag tenker man at det foreligger en multifaktoriell etiologi der genetisk disposisjon, miljømessige faktorer (infeksjoner og toksiner) og både det ikke-adaptive og det adaptive immunforsvar er involvert. Dette inkluderer forstyrrelser i reguleringen av cytokiner, komplementkaskaden, B-celleimmunitet og T-cellesignalering. Men det finnes mye som fremdeles ikke er klarlagt, og sykdommens heterogenitet har gjort det vanskelig å få en forståelse for den komplette sykdomsmekanismen (26).

SLE er assosiert til problemer med å kvitte seg med apoptotisk materiale, som kan være DNA-materiale fra døde celler. Apoptose er programmert celledød, og døende celler uttrykker signaler for å tiltrekke makrofager og dendritiske som stimulerer de sirkulerende immunceller til fagocytose. Dersom fagocytene ikke klarer å fjerne apoptotisk materiale effektivt vil fragmenter av nukleære partikler kunne fanges av antigenpresenterende celler, og via interaksjon med T- og B-celler vil dette til slutt føre til utviklingen av antinukleære antistoffer (ANA) som er typiske for sykdommen. Disse antistoffene vil kunne infiltrere mange ulike typer vev og gi vevsskade (15).

### 1.9.5 SLE og cytokiner

Av kjente involverte cytokiner i den inflammatoriske prosessen er blant annet B-lymfocyt stimulator (Blys), interleukin (IL6), IL17 og IL18, type 1 IFN, TNF-alfa og TGF-beta.

Ytterligere kunnskap om cytokinenes rolle vil kunne gi muligheter for klinisk bruk, både i forhold til diagnostikk og relasjon til sykdomsaktivitet (15). Fortsatt vet vi lite om akkurat hva som initierer sykdommen. De fleste av reseptorene og signalmolekylene har blitt identifisert, men hva som i utgangspunktet setter den autoimmune aktiveringen i gang er uvisst (26).

### 1.9.6 Medikamentell behandling ved SLE

Per dags dato finnes ingen kurativ behandling for SLE. Basisbehandlingen av SLE er i dag antimalariamidler, vanligvis hydroksyklorokin (7, s. 103).

Alvorligere sykdom med f.eks. renale og nevropsykiatriske manifestasjoner krever kombinasjonsbehandling av steroider og immunosuppressiva som cyklofosamid (cytostatikum (27), azatioprin (immunosuppressivt middel (28), metotreksat (cytostatikum (29) og mycofenolat (immunosuppressivt middel (30) (31).

I 2011 godkjente amerikanske «US Food and Drug Administration» (FDA) for første gang et medikament spesifikt for behandling av SLE. Dette medikamentet, Belimumab, er et monoklonalt antistoff som binder og nøytraliserer B-lymfocyt stimulator (Blys, også kjent som BAFF). Men en betydelig andel av SLE-pasientene har ikke effekt av Belimumab, derfor er det fortsatt i stor grad ikke-måltrettet og generell immunosuppresjon som gis ved behandling for sykdommen (32, 33).

### 1.10 Granulomatøs polyangiitt (GPA)

Granulomatøs polyangiitt (tidligere kalt Wegener's granulomatose) er en annen kronisk, systemisk autoimmun sykdom. Ubehandlet har sykdommen en høy mortalitet, samtidig som nyere behandlingsstrategier gir risiko for behandlingsrelatert morbiditet (34, 35).

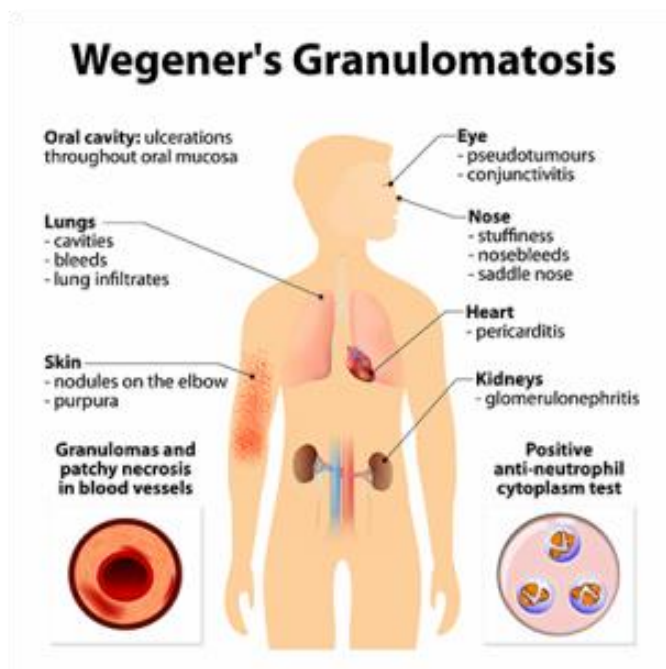
Antinøytrofile cytoplasmiske antistoffer (ANCA) spiller en sentral rolle i patogenesen til sykdommen, og den klassifiseres derfor som en av flere ANCA-assosierte vaskulitter (AAV).

### 1.10.1 Epidemiologi

Epidemiologien til ANCA-assosiert vaskulitt (AAV) varierer geografisk. GPA opptrer hyppigere hos kaukasiere enn øvrige raser, og er vanligst i Nord-Europa. En engelsk-japansk studie fra 2011 viste at den gjennomsnittlige årlige insidensen av AAV fra 2005-2009 var 21,8 per million voksne i Storbritannia (36). Prevalensen av GPA har siden år 2000 vært 160 per million i Nord-Europa. Den høyeste insidensen finnes hos menn mellom 60-70 år, dog finnes liten forskjell mellom kjønnene (37). Risikofaktorer for sykdommen er visse medikamenter som propylthiouracil (gis mot hypertyreose), infeksjoner (inkludert s. aureus-infeksjon) samt genetisk predisposisjon (38).

### 1.10.2 Kliniske manifestasjoner

I den klinisk klassiske triaden hos pasienter med GPA inngår granulomatøs, nekrotiserende inflammasjon i luftveiene, fokal glomerulonefritt og nekrotiserende vaskulitt. Tidligere delte man pasientene inn i undergrupper på bakgrunn av om de hadde symptomer fra øvre luftveier, lungene eller nyrene. Dog er en blanding av symptomer fra de ulike organsystemene det vanligste (7, s. 110-111).



Figur 8 Kliniske manifestasjoner av granulomatøs polyangiitt, tidligere kalt Wegener's granulomatose.

Kilde: Vasculitis Europe. GPA granulomatosis with polyangiitis <http://www.vasculitis.eu/gpawegener.html> (15.05.2017).

GPA vil typisk ha to faser. Den initiale fasen vil ofte utgjøres av sykdomsutslag i ører, nese og svelg (34, 35). Før det har blitt satt en diagnose vil mange av pasientene være plaget av symptomer fra ører, nese, hals og luftveier. De opplever nesetetthet, ørebetennelser og residiverende bihulebetennelser, sistnevnte som vanligste symptom. Mange utvikler ulcerasjoner i nesa og det kan sees destruksjon nesebrusk med utvikling av karakteristisk sadelnese. Ved affeksjon av lungene med granulom-dannelse kan pasienten oppleve hemoptyse, hoste og dyspné (7, s. 110).



Figur 9 17 år gammel kvinne med sadelnese-deformitet

Kilde: Research Gate. Saddle nose deformity [https://www.researchgate.net/figure/23258140\\_fig3\\_A-17-year-old-woman-with-Wegener-granulomatosis-and-a-severe-saddle-nose-deformity-A-and](https://www.researchgate.net/figure/23258140_fig3_A-17-year-old-woman-with-Wegener-granulomatosis-and-a-severe-saddle-nose-deformity-A-and) (15.05.2017)

Den alvorlige og generaliserte fasen karakteriseres av raskt progressiv glomerulonefritt, pulmonal blødning og/eller artritt (34, 35). Typisk ved renal affeksjon av GPA er segmental nekrotiserende glomerulonefritt, ofte med halvmånedannelse. Dette gir hematuri, proteinuri og hos noen redusert filtrasjon over glomeruli med redusert nyrefunksjon. I verste fall utvikler pasienten nyresvikt og vil måtte behøve dialyse (7, s. 110). Prognosen for dialysekrevene pasienter med GPA er dårlig. En europeisk studie fra 2007 så på denne gruppen, og de observerte at 25% av pasientene var døde etter et år (39).

Vaskulitt er karakterisert av den histologiske triaden leukocyt-infiltrasjon, fibrinoid nekrose av blodåreveggen og trombotisk vaskulær okklusjon.

Når store årer er involvert og kun deler av åreveggen er affisert kan inflammasjonen føre til svakhet, og det dannes et aneurisme i stedet for en okklusjon. De mest alvorlige og potensielt dødelige konsekvensene av sykdommen varierer derfor mellom infarkt i vitale organer og blødning som følge av et rumpert aneurisme (40).

### 1.10.3 Klassifikasjonskriterier

ACR-klassifikasjonskriterier for GPA, krever 2 av følgende kriterier for å være oppfylt:

- Urinsediment med erythrocytturi/røde blodlegemesylindre
- Røntgen thorax: noduli, kaviteter, infiltrater
- Orale ulcera eller nesetetthet
- Histologisk påvist granulomatøs infiltrasjon (10)

### 1.10.4 Patofysiologi

Sykdommens etiologi er uklar. Men både det medfødte og det adaptive immunforsvaret har en funksjon i sykdomsmekanismene til GPA (35). Det er uklart hvordan ANCA utvikles, men B-celler er sentrale både som forløpere for de ANCA-produserende plasmacellene, og mulig også som antigenpresenterende- og cytokinproduserende celler. Patogenesen til de vaskulittiske prosessene ved GPA og deres assosiasjon med ANCA er relativt godt forstått, men det samme gjelder ikke for den granulomatøse delen av sykdommen.

### 1.10.5 GPA og cytokiner

I granulomene hos pasienter med GPA kan man vanligvis se makrofager, nøytrofile granulocytter og lymfocytter. T-cellene er vanligvis av Th1-type, og de skiller blant annet ut cytokinene IFN- $\gamma$  og TNF- $\alpha$  (34). Den granulomatøse inflammasjonen i GPA er altså primært drevet Th1-cytokiner (41). TGF- $\beta$ 1 er immunregulerende cytokiner som kan nedregulere responsen til Th1-celler.

#### 1.10.6 Medikamentell behandling ved GPA

Behandling av GPA inndeles i tre faser; induksjon av remisjon, vedlikeholdsbehandling og residivbehandling. Behandling består av immunmodulerende legemiddel som kortison, ulike former av cytostatika (som cyklofosamid, metotrexat og azatioprin) og/eller rituximab (42). Rituximab er et monoklonalt CD20 (B-celle)-antistoff.

Det ble godkjent av amerikanske «US Food and Drug Administration» (FDA) i 2011 for vedlikeholdsbehandling av alvorlig GPA. Rituximab er derfor et alternativ til generelle immunsuppressive medikamenter ved GPA. Det har, i motsetning til de andre behandlingalternativene, en direkte virkningsmekanisme rettet mot B-cellene (43).

## 2 Formål

Formålet med studien er todelt; å undersøke om det er forskjell i serumkonsentrasjoner av TGF- $\beta$  hos pasienter med systemisk lupus erythematosus og granulomatøs polyangiitt, samt om de er en forskjell i serumkonsentrasjonen mellom disse pasientgruppene og friske kontroller.

## 3 Materiale

Pasientene i studien er inkludert fra Tromsø Lupus cohort. Denne inkluderer opplysninger for pasienter fra revmatologisk avdeling eller poliklinikk ved UNN, Finnmarksykehuset, Rehabiliteringssenteret Nord-Norges Kurbad og friske kontroller. Alle har samtykket til deltakelse i studier. Regional etisk komite (REK) har godkjent prosjektet (2015/1400). Deltagerinformasjon og prøvemateriale (serum) er hentet fra Generell biobank for revmatologisk sykdommer, godkjent av REK (2014/1888), ved Revmatologisk laboratorium, Ben- og ledd forskningsgruppe ved Helsefak, UiT.

Pasientene med SLE oppfylte ACR97 klassifikasjonskriterier og pasientene med GPA oppfylte minst 2 av sine respektive ACR-kriterier. Ved analyse av IFN- $\gamma$  ble det inkludert er 48 pasienter med SLE, 60 pasienter med GPA og 39 friske kontroller. Ved analyse av TGF- $\beta$  er det inkludert 91 pasienter med SLE, 30 pasienter med GPA og 38 friske kontroller. Eksklusjonskriterier er pasienter med kroniske psykiske sykdommer eller alvorlige somatiske sykdommer.

## 4 Metode

Oppgaven er en tverrsnittstudie. Serumkonsentrasjon av IFN- $\gamma$  og TGF- $\beta$  er målt med DuoSet ELISA Human, en form for *Sandwich-ELISA*. Dog fikk vi ingen utslag på kjøringene av IFN- $\gamma$  i noen av utvalgene. De er derfor ikke beskrevet nærmere i oppgaven, men mulige årsaker til dette er drøftet under «diskusjon». Datamaterialet er analysert med t-test. Statistiske analyser er gjort med SPSS v24.0.

I de følgende avsnittene vil grunnlaget for ELISA-metodikken samt bakgrunn for de statistiske beregningene presenteres. Deretter følger en beskrivelse av hva som er gjennomført, både av laboratoriarbeid og statistiske beregninger. Detaljert protokoll for ELISA-kjøringene ligger vedlagt (vedlegg 10 og 11). Det er laget en egen ordliste til den laboratorierelatert delen av studien (vedlegg 9).

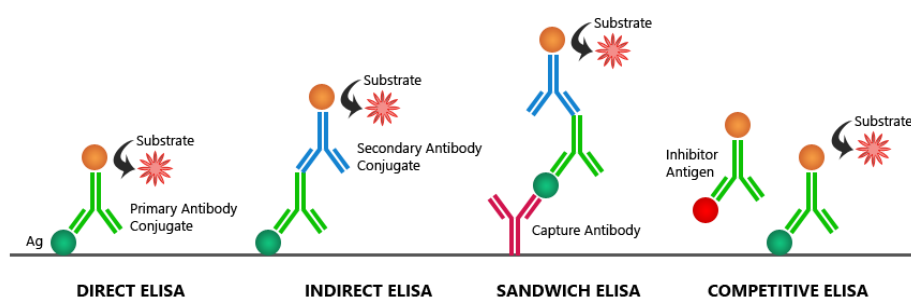
### 4.1 ELISA-teknikk

ELISA står for «*Enzyme linked immunosorbent assay*». Det er en analysemetode som benytter antistoffer sammen med en enzymreaksjon for å bestemme tilstedeværelse eller kvantitet av en komponent (et antigen) i en prøve. Det benyttes plater med separerte kamre eller «brønner», standard er 96-brønnsplater. Den enkleste formen for ELISA er såkalt direkte ELISA. Antigener, prøvens *analytt*, festes til overflatene i brønnene. Deretter tilsettes antistoff som binder til antigenet. Dette antistoffet er koblet til et enzym, og i det siste steget av analysen vil enzymets substrat tilsettes. Den påfølgende enzymreaksjonen produserer et detekterbart signal, vanligvis en fargeforandring i substratet. Dette signalet indikerer kvantiteten av antigen i prøven, som regel ved hjelp av en påfølgende spektrofotometrisk analyse (44).

En ulempe ved den direkte ELISA-metoden er at antigen-festingen til overflaten av brønnen er uspesifikk. Når serum brukes som kilde til antigen kan i prinsippet alle proteinene i prøven feste seg til plastbrønnens overflate. Små konsentrasjoner av analytt i serum må konkurrere med andre serumproteiner når de binder til brønnens overflate. *Sandwich-ELISA* løser dette problemet ved at det brukes et «fangende antistoff», *capture antibody*, spesifikt for analytten for å dra det ut av serumets molekylære mikstur. Overflatene av brønnene må derfor forberedes ved at fangende antistoff tilsettes.



I tillegg må alle andre frie overflater blokkeres ved hjelp av en såkalt «blocker». Dette muliggjør optimale undersøkelser med en høy tetthet av fangede antistoff på overflatene. Uten blocking ville ulike andre komponenter av prøven binde til overflaten, noe som kan føre til falske resultater eller høye bakgrunnssignaler. Det klassiske valget av blocker er BSA (bovine serum albumin). Deretter kan antistoff, *detection antibody*, tilsettes. Ved deretter å tilsette et enzym (for eksempel streptavidin-HRP) og til slutt en substratløsning vil farge utvikle seg proporsjonalt med mengden bundet analytt (45-47)



Figur 10 Illustrasjon av ELISA-metodikk

Kilde: Boster. ELISA fundamental principles, how ELISA works <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle> (17.08.2016)

## 4.2 Analyser på laboratoriet

Laboratorieanalysene ble gjennomført på Revmatologisk laboratorium (Universitetet i Tromsø) og gjennomført med to kommersielle DuoSet ELISA-kits fra R&D Systems (48, 49).

For ordliste og detaljert protokoll for ELISA-kjøringene, se vedlegg 9-11.

Type analyse:	Antall SLE-pasienter	Antall GPA-pasienter	Antall friske kontrollere
DuoSet ELISA Human IFN- $\gamma$	48	60	39
DuoSet ELISA Human TGF- $\beta$ 1	91	30	38

### 4.3 Statistiske metoder

Variablers målenivå gir uttrykk for hvor nyansert og detaljert informasjon variabelen gir, samt hvilke metoder som kan brukes i analyser av denne. Variabler kan settes til ett av tre målenivåer; nominalt nivå, ordinale nivå eller intervallnivå. Målinger på intervallnivå gir mer informasjon enn målinger på nominal- og ordinalnivået (50, s. 8-10, 51, s. 32-33). I denne studien hadde vi både nominale variabler (diagnose, kjønn) og kontinuerlige intervallvariabler (alder, nivå av TGF- $\beta$ ).

Når man bruker statistikk for å kunne svare på en hypotese vil man avgjøre hvor sannsynlig det er at observerte forskjeller skyldes tilfeldig variasjon. Ofte benyttes en terskel på 5% for konfidens; kun når det er en 5% sjans (eller 0,05 sannsynlighet) for å få et visst datamateriale dersom intet utfall eksisterer, kan vi være sikre nok til å si at utfallet eksisterer. Denne konfidensterskelen skrives som  $p < 0,05$  (50, s. 60-61). Vi har også benyttet en konfidensterskel for statistisk signifikans på  $p < 0,05$  i studien. Utvalgsstørrelse påvirker hvorvidt en forskjell mellom utvalg blir signifikante eller ikke. I store utvalg vil selv små forskjeller kunne være signifikante, og i små utvalg vil store forskjeller kunne være ikke-signifikante (50, s. 43-44). Våre utvalg var alle på 30 eller flere, dog var utvalgene relativt små.

Ved statistiske beregninger opererer en også med det som kalles standardavvik (eng. «standard deviation», forkortet SD), som er et mål på den gjennomsnittlige spredningen i et utvalg. Et lite SD (relativt til størrelsen på gjennomsnittet) indikerer at dataene er nært gjennomsnittet. Et stort SD indikerer at dataene er langt fra gjennomsnittet. Dersom gjennomsnittet er en god representasjon for datamaterialet vil de fleste av scorene være i en klynge nært gjennomsnittet, og standardavviket vil være lite (50, s. 26-27).

Konfidensintervaller (KI) forteller oss sannsynligheten for at de gitte intervallene innbefatter den sanne verdien til parameteren vi prøver å estimere. Det er en sammenheng mellom konfidensintervaller og statistisk signifikans (50, s. 71). Vi oppgir både standardavvik og konfidensintervaller i resultatene.

For å kunne trekke konklusjoner på bakgrunn av statistikk er vi avhengige av å benytte passende statistiske modeller eller tester som nøyaktig gjenspeiler det observerte datasettet. Hvilken statistikktest en bruker for å teste en observert forskjell avhenger av flere forhold. Dette inkluderer dataenes målenivå, om en sammenligner forskjellige utvalg eller om det foreligger flere målinger av de samme personene (pardata). Sentralt er også størrelsen på utvalgene, og hvor mange utvalg som sammenlignes. Vi har benyttet T-test i våre beregninger, som er passende ettersom utvalgene er relativt små og vi har data på intervallnivå (51, s. 86-88).

## 5 Resultater

### 5.1 Kjønn- og aldersfordeling i utvalgene

	<b>SLE</b>	<b>GPA</b>	<b>Kontroll</b>
<b>Kjønnsfordeling</b>	Kvinner n = 80 Menn n = 11 Totalt n = 91	Kvinner n = 12 Menn n = 18 Totalt n = 30	Kvinner n = 28 Menn n = 10 Totalt n = 38
<b>Gjennomsnittlig alder</b>	48 år (SD ± 15)	50 år (SD ± 13)	44 år (SD ± 14)

Tabell 2 Kjønn- og aldersfordeling i utvalgene

Ved analyse av TGF- $\beta$ 1 var det inkludert 91 pasienter med SLE (88% kvinner), 30 pasienter med GPA (40% kvinner) og 38 friske kontroller (74% kvinner). Av pasientene med SLE var det 11 menn og 80 kvinner, av pasientene med GPA var det 18 menn og 12 kvinner og blant kontrollene var det 10 menn og 28 kvinner,

Gjennomsnittlig alder var 48 år for pasientene med SLE, 50 år for pasientene med GPA og 44 år for kontrollene.

### 5.1.1 T-test for aldersfordeling i utvalgene

	<b>SLE/GPA</b>	<b>SLE/kontroll</b>	<b>GPA/kontroll</b>
<b>t</b>	-0,82	-1,16	-1,73
<b>p-verdi</b>	0,412	0,248	0,088
<b>95% KI</b>	[-8.71, 3.59]	[-9.16, 2.39]	[-12.79, 0.91]
<b>Standardfeil</b>	3,11	2,98	3,43

Tabell 3 T-test for aldersfordeling i utvalgene

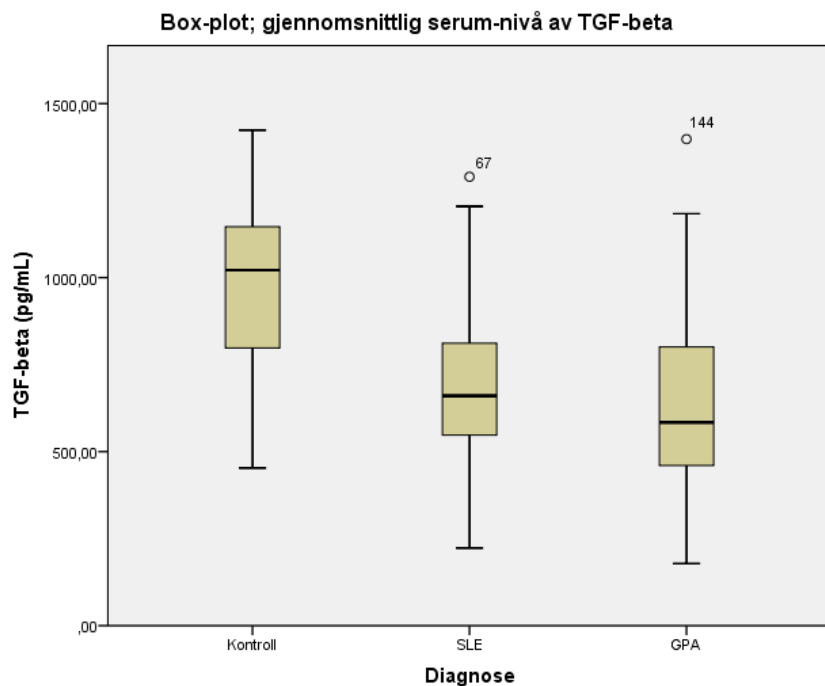
Vi fant ingen signifikant forskjell i alder mellom noen av de ulike gruppene ( $p = 0,4$ ,  $p = 0,2$  og  $p = 0,08$ ).

### 5.2 Nivå av TGF- $\beta$ (pg/mL) i serum

<b>SLE</b>	<b>GPA</b>	<b>Kontroll</b>
695,63 (SD $\pm$ 192)	655,19 (SD $\pm$ 277)	977,80 (SD $\pm$ 219)

Tabell 4 Gjennomsnittlig nivå av TGF-beta i serum (pg/mL)

Pasientene med SLE hadde gjennomsnittlig 696 pg/mL, pasientene med GPA 655 pg/mL og kontrollene hadde gjennomsnittlig 978 pg/mL TGF- $\beta$  i sine serumprøver.



Figur 11: Nivå av TGF- $\beta$  i serum er lavere hos pasientene med SLE ( $p = 0,000$ ) og GPA ( $p = 0,000$ ) sammenlignet med friske kontroller. Det var ingen signifikant forskjell i nivå av TGF- $\beta$  hos pasientene med SLE og pasientene med GPA ( $p = 0,375$ ).

Resultatene er presentert i et box-plot. Sentrum av boksen er medianen (sort linje), resten av boksen representerer grensene for hvor 50% av observasjonene faller (eng. «interquartile range», IQR). Strekene ut fra boksen representerer de øverste og nederste 25% av scorene. Markert med en sirkel og tall er «outliers», som er scorer som er større enn øvre kvartil pluss 1,5 ganger IQR. Disse er ekskludert ved beregning av kvartilene.

### 5.2.1 T-test for nivå av TGF- $\beta$ i utvalgene

	<b>SLE/kontroll</b>	<b>SLE/GPA</b>	<b>GPA/kontroll</b>
<b>t</b>	0,89	7,29	5,37
<b>p-verdi</b>	0,000	0,375	0,000
<b>95% KI</b>	[205.62, 358.73]	[49.52, 130.41]	[202.57, 442.66]
<b>Standardfeil</b>	38,69	45,43	60,13

Tabell 5 T-test for gjennomsnittlig nivå av TGF-beta i gruppene

Pasientene med SLE hadde signifikant lavere verdier av TGF- $\beta$  sammenlignet med kontrollene ( $p = 0,000$ ). Også pasientene med GPA hadde signifikant lavere verdier i forhold til kontrollene ( $p = 0,000$ ). Det var ingen signifikant forskjell mellom pasientene med SLE og pasientene med GPA ( $p = 0,375$ ) (figur 10 og tabell 6).

## 6 Diskusjon

Vi fant at TGF- $\beta$  har lavere konsentrasjon i serum både ved SLE og GPA sammenlignet med friske kontroller. Dette underbygger tidligere funn hos pasienter med systemisk lupus erythematosus, og er ny kunnskap om pasienter med granulomatøs polyangiitt.

I 2010 ble det gjennomført en tverrsnittstudie ved Universitetssykehuset Nord-Norge (Becker-Merok, Eilertsen, Nossent). De undersøkte en rekke inflammatoriske og immunmodulerende cytokiner for å bestemme deres verdi som biomarkører ved SLE, inkludert TGF- $\beta$ . Man fant her at pasienter med SLE hadde lavere nivåer av TGF- $\beta$ 1 og IL-1 $\beta$  sammenlignet med friske kontroller. Det fantes ingen konsekvente sykdomsassociasjoner for de andre undersøkte cytokinene (52). I en polsk studie fra 2009 undersøkte de serumnivåer av flere angiogene cytokiner hos SLE-pasienter, heriblant TGF- $\beta$ . Her fant man ingen signifikant forskjell i nivåer mellom den totale SLE-gruppen og de friske kontrollene, men de nydiagnostiserte SLE-pasientene hadde signifikant lavere nivåer av serum-TGF- $\beta$  sammenlignet med de friske kontrollene (53). Allerede sent på 90-tallet påviste Ohtsuka og medarbeidere lave nivåer av TGF- $\beta$  i lymfocytt-cellekulturer fra SLE-pasienter (54). Den samme forskningsgruppen undersøkte sammenhengen mellom nivå av TGF- $\beta$  og sykdomsaktivitet hos SLE-pasientene, men kunne her ikke påvise en sammenheng (55).

Gen-polymorfisme er det samme som genetisk variasjon. Da finnes to eller flere varianter av et gen hos en viss andel av befolkningen. Dette kan også forekomme i delene av DNA-et som koder for et bestemt protein eller styrer produksjonen av molekyler i kroppen. Derfor vil man også se at proteiner og molekyler finnes i ulike mengder hos ulike individer (56). Forskjeller i cytokin-profil mellom individer ser ut til å i alle fall delvis skyldes genetisk variasjon i de regulatoriske regionene av cytokin-genet.

Klinikken ved sykdommer der immunforsvaret er involvert ser ut til å være påvirket av balansen i produksjonen mellom pro-inflammatoriske og anti-inflammatoriske cytokiner. Det har derfor vært stor forskningsinteresse knyttet til gen-regulering av cytokinuttrykk (57).

Flere forskere har undersøkt gen-polymorfismer knyttet til TGF- $\beta$ 1 hos SLE-pasienter. Wang og medarbeidere fant i sin studie en sammenheng mellom en spesifikk gen-polymorfisme i TGF- $\beta$ 1 genet kalt T869C, og utviklingen av auto-antistoffer hos pasienter med SLE. Men de kunne ikke finne noen sammenheng mellom serum-nivå av TGF- $\beta$ 1 og T869C (58). Heller ikke Sayed og medarbeidere kunne finne en sammenheng mellom T869C og SLE, men de kunne påvise signifikant lavere nivåer av TGF- $\beta$ 1 hos pasientene med såkalt TT-genotype sammenlignet med CC-genotype, spesielt i kombinasjon med polymorfismen T869C.

Serumnivåene av TGF- $\beta$  var signifikant lavere hos SLE-pasientene, spesielt pasientene med lupus-*nefritt* (59). I 2004 undersøkt Lu og medarbeidere 5 ulike polymorfismer i TGF- $\beta$ 1-genet samt serumnivå av cytokinet hos SLE-pasienter og matchede, friske kontrollere. De fant i likhet med de fleste andre studier lave serumnivåer av TGF- $\beta$ 1 hos SLE-pasientene, og enda lavere nivåer hos SLE-pasientene som hadde utviklet lupus-*nefritt*. Men det var ingen assosiasjon mellom de undersøkte polymorfismene og utvikling av SLE med eller uten lupus-*nefritt*. De konkluderte med at det behøves flere studier for å fastslå om de lave cytokinnivåene skyldes genetiske forhold (polymorfismer) eller om nivåene er en følge av pågående cellulære interaksjoner der cytokinet forbrukes (60). Polymorfisme til TGF- $\beta$ 1 er ikke undersøkt hos SLE pasientene i denne studien, og da det er sprikende funn i andre studier er det sannsynligvis ikke sammenheng mellom T869C og SLE. Pasientene med SLE i vår studie er ikke gruppert med- og uten lupus-*nefritt*, men siden andre studier viser en klar sammenheng mellom TGF- $\beta$ 1nivå i serum og lupus *nefritt*, ville det vært relevant å forske nærmere på dette.

En tysk tverrsnittstudie gjennomført i 2001 av Murakozy et. al. undersøkte om visse former for genetisk variasjon (polymorfisme) i genene som koder for angiotensin-converting enzyme (ACE), TGF- $\beta$ 1 og interleukin-10 (IL-10) opptrer med ulik frekvens hos pasienter med GPA i forhold til kontrollere. De fant en trend mot at pasientene med GPA hadde genotyper assosiert med redusert frigjøring av IL-10 og TGF- $\beta$ 1.

Funnene var ikke-signifikante, men styrker likevel hypotesen om at ulike immunregulerende cytokin-mønstre, som følge av gen-polymorfismer, kan være involvert i patogenesen ved GPA (61). Dog finnes sprikende resultater. En nederlandsk studie fra 1996 viste høye nivåer av TGF- $\beta$  i plasma og cellekulturer fra pasienter med ANCA-assosiert vaskulitt, inkludert pasienter med GPA. Nivå av TGF- $\beta$  i plasma korrelerte med andre parametre som CRP, leukocyt-tall og senkningsreaksjon (62). Ved søk i PubMed kan jeg ikke finne studier som har påvist lave serumnivåer av TGF- $\beta$  hos pasienter med GPA. Assosiasjonen mellom TGF- $\beta$  og GPA er i liten grad undersøkt tidligere, og det behøves flere studier for eventuelt å kunne underbygge en hypotese om lave serum-nivåer av TGF- $\beta$  hos denne pasientgruppen som ledd i sykdomsmekanismen.

Vi fikk ikke utslag på ELISA-kjøringene for IFN- $\gamma$ , verken hos pasientutvalgene eller kontrollene. Ved søk i PubMed for studier der serum-IFN- $\gamma$  er analysert med ELISA fant jeg ingen studier der dette er gjort på pasienter med SLE eller GPA med positivt resultat. Men det finnes studier der dette er gjort på andre pasientgrupper (med positivt resultat), blant annet pasienter multippel sklerose (MS) (63), dengue-feber (64) og depressive lidelser (65). Dette tyder på at det skal være mulig å påvise IFN- $\gamma$  i serum. En japansk studie fra 2007 undersøkte cellekulturer av perifere T-celler og deres uttrykk av IFN- $\gamma$  med ELISA-metodikk, og fant at SLE-pasientene hadde signifikant høyere nivåer av IFN- $\gamma$  (66). En israelsk studie fra 1997 undersøkte gen-uttrykk i perifere mononukleære celler og man fant at SLE-pasientene hadde en hyperaktivitet i sitt IFN- $\gamma$ -gen (67). Det anses derfor som sannsynlig at IFN- $\gamma$  kan ha en rolle i patogenesen ved SLE. Flere studier har også pekt i retning av at IFN- $\gamma$  inngår i sykdomsmekanismen ved GPA. Den såkalte IFN +874 genotypen har blitt påvist med økt hyppighet hos pasienter med GPA, særlig pasientene med nyresvikt i endestadiet (68). IFN- $\gamma$  ser også ut til å være en sentralt cytokin ved dannelsen av den granulomatøse inflammasjonen ved GPA (69, 70). Det er mulig at vi ikke fikk resultater på grunn av konsentrasjonen av IFN- $\gamma$  i serum ikke var målbar, feil i ELISA-kit eller feil i metoden. Analysene er gjennomført ved Revmatologisk laboratorium under Ben- og ledd forskningsgruppe ved Helsefak, Universitetet i Tromsø. Laboratoriet har lang erfaring med cytokin-analyser, noe som gjør metodefeil mindre sannsynlig. Analysene burde gjentas med nye ELISA-kit før vi kan konkludere med årsak til resultatsvikt.



En svakhet ved denne studien er at vi hadde inkludert et lavt antall pasienter og kontroller, spesielt pasienter med GPA og friske kontroller (30 pasienter med GPA og 28 kontroller). Ved små utvalg er det mindre sannsynlig at man finner effekter som virkelig er sanne. Større utvalg er bedre anslag av befolkningen og vil derfor ha mindre utvalgsfeil. Dette gjør funnene mer reproducerbare (50, s. 42). Ifølge Button med flere vil man «...ved små utvalg oftere overestimere effektstørrelse, noe som negativt vil påvirke sannsynligheten for at et statistisk signifikant funn gjenspeiler en sann effekt» (71). Dette er viktig å være oppmerksom på ved tolkning av resultater fra studier med små utvalg. Ved de statistiske beregningene fikk vi brede 95% konfidensintervaller, noe som kommer som følge av de små utvalg. Også dette forteller oss at det foreligger usikkerhet omkring resultatet.

## 7 Konklusjon

Serumkonsentrasjon av IFN- $\gamma$  og TGF- $\beta$  hos pasienter med SLE, granulomatøs polyangiitt og friske kontroller ble målt med DuoSet ELISA Human. Vi fikk ingen utslag på kjøringene av IFN- $\gamma$ . Ved kjøringene av TGF- $\beta$  hadde pasientene med SLE gjennomsnittlig serumkonsentrasjon på 696 pg/mL, pasientene med GPA 655 pg/mL og kontrollene 978 pg/mL. Pasientene med SLE hadde signifikant lavere verdier av TGF- $\beta$  sammenlignet med kontrollene ( $p = 0,000$ , KI [49,130]). Også pasientene med GPA hadde signifikant lavere verdier i forhold til kontrollene ( $p = 0,000$ , KI [202,442]). Det var ingen signifikant forskjell mellom pasientene med SLE og pasientene med GPA ( $p = 0,375$ , KI [205,358]).

Funnene er forenelige med tidligere funn hos pasienter med systemisk lupus erythematosus, og bidrar med ny kunnskap om pasienter med granulomatøs polyangiitt. Sammenhengen mellom serumkonsentrasjoner av TGF- $\beta$  og GPA er ikke undersøkt tidligere. Vi vet ikke om de lave serumkonsentrasjonene i pasientgruppene skyldes redusert produksjon av TGF- $\beta$  eller om det skyldes økt forbruk og/eller binding ved pågående inflammasjon. Dersom årsaken er redusert produksjon vil genetisk variasjon i form av polymorfismer kunne være en del av forklaringen. Enn så lenge har man ikke klart å entydig påvise gen-polymorfismer knyttet til redusert produksjon av TGF- $\beta$  i disse pasientgruppene. Ytterligere forskning behøves for kartlegging av patogene mekanismer ved både SLE og GPA, med videre identifisering av terapeutiske mål.

Det er usannsynlig at to heterogene og komplekse sykdommer som disse kan behandles ved kun å rette seg mot én biologisk signalvei. Felles for dem begge er at de har lave serumkonsentrasjoner av TGF- $\beta$  i forhold til friske kontroller. Det kan tenkes at et medikament som fremmet produksjonen av TGF- $\beta$  ville hatt en gunstig effekt ved SLE og GPA, som én ny brikke i sykdommenes puslespill.

## 8 Referanseliste

1. Lea T. Immunologi og immunologiske teknikker. Bergen: Fagbokforlaget, 2008.
2. Hoffbrand AV, Moss PAH. Hoffbrand's Essential haematology, 6th edition. New York: Wiley-Blackwell, 2015.
3. Agger R, Nielsen CH, Leslie G, Aasted B. Immunologi. København: Munksgaard Danmark, 2011.
4. Karpuzoglu E, Zouali M. The multi-faceted influences of estrogen on lymphocytes: toward novel immuno-interventions strategies for autoimmunity management. Clin Rev Allergy Immunol 2011; 40: 16-26.
5. Sheng J, Chen W, Zhu HJ. The immune suppressive function of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human diseases. Growth Factors 2015; 33: 92-101.
6. Bluestone JA, Bour-Jordan H, Cheng M, et al. T cells in the control of organ-specific autoimmunity. The Journal of clinical investigation 2015; 125: 2250-60.
7. Gran JT. Innføring i klinisk revmatologi. Oslo: Gyldendal akademisk, 2009.
8. American College of Rheumatology. About us. <https://www.rheumatology.org/About-Us> (05.05.2017)
9. Petri M, Orbai AM, Alarcon GS, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2012; 64: 2677-86.
10. Arthritis and Rheumatism, Wiley Online Library. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegeners granulomatosis <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.1780330807/pdf> (17.04.2017)
11. Lerang K, Gilboe I, Garen T, et. al. High incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus in Norway Lupus 2012; 21: 1362-9.
12. Eilertsen GO, Becker-Merok A, Nossent JC. The influence of the 1997 updated classification criteria for systemic lupus erythematosus: epidemiology, disease presentation, and patient management. J Rheumatol 2009; 36: 552-9.
13. Lerang K, Gilboe IM, Thelle DS, et al. Mortality and years of potential life loss in systemic lupus erythematosus: a population-based cohort study Lupus 2014; 23: 1546-52.
14. Nossent HC. Systemic lupus erythematosus in the Arctic region of Norway The Journal of Immunology 2001; 28: 539-46
15. Lisnevskaja L, Murphy G, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus. The Lancet 2014; 384: 1878-88.
16. Magro-Checa C, Zirkzee EJ, Huizinga TW, et al. Management of Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus: Current Approaches and Future Perspectives. Drugs 2016; 76: 459-83.
17. Hanly JG, Urowitz MB, Sanchez-Guerrero J, et al. Neuropsychiatric events at the time of diagnosis of systemic lupus erythematosus: an international inception cohort study. Arthritis Rheum 2007; 56: 265-73.
18. Stefanidou SB, Galanopoulou A, Chatziyannis V, et. al. Clinical expression and morbidity of systemic lupus erythematosus during a 5-year follow-up: a male:female comparison Lupus 2011; 20: 1090-4

19. Jain D, Halushka MK. Cardiac pathology of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2009; 62: 584-92.
20. Urowitz MB, Gladman D, Ibanez D, et al. Atherosclerotic vascular events in a multinational inception cohort of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010; 62: 881-7.
21. Kiani AN, Magder LS, Post WS, et al. Coronary calcification in SLE: comparison with the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2015; 54: 1976-81.
22. Sa Ribeiro D, Galvao V, Luiz Fernandes J, et al. Magnetic resonance imaging of Jaccoud's arthropathy in systemic lupus erythematosus. *Joint Bone Spine* 2010; 77: 241-5.
23. Seligman VL, Olson R, Li J, et al. Demographic Differences in the Development of Lupus Nephritis: A Retrospective Analysis. *The American Journal of Medicine* 2002; 112: 726-9.
24. Chen YE, Korbet SM, Katz RS, et al. Value of a complete or partial remission in severe lupus nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 46-53.
25. American College of Rheumatology. 1997 update of the 1982 American College of Rheumatology revised criteria for classification of systemic lupus erythematosus. <https://www.rheumatology.org/Portals/0/Files/1997%20Update%20of%201982%20Revised.pdf> (06.04.2017)
26. Marion TN, Postlethwaite AE. Chance, genetics, and the heterogeneity of disease and pathogenesis in systemic lupus erythematosus. *Seminars in immunopathology* 2014; 36: 495-517.
27. Felleskatalogen. Sendoxan (Baxter), Cyklofosfamid <https://www.felleskatalogen.no/medisin/sendoxan-baxter-563813> (22.05.2017)
28. Felleskatalogen. Imurel (Aspen Pharma), Azatioprin <https://www.felleskatalogen.no/medisin/imurel-aspen-pharma-trading-ltd-560041> (22.05.2017)
29. Felleskatalogen. Methotrexate (Pfizer) <https://www.felleskatalogen.no/medisin/methotrexate-pfizer-561415> (22.05.2017)
30. Felleskatalogen. Mycophenolatemofetil (Accord) <https://www.felleskatalogen.no/medisin/mycophenolatemofetil-accord-accord-healthcare-589591> (22.05.2017)
31. Norsk elektronisk legehåndbok. Systemisk lupus erythematosus <https://legehandboka.no/handboken/kliniske-kapitler/revmatologi/tilstander-og-sykdommer/systemiske-inflamasjoner/systemisk-lupus-erytematosus/> (22.05.2017)
32. Stohl W, Hilbert DM. The discovery and development of belimumab: the anti-BLyS-lupus connection. *Nat Biotechnol* 2012; 30: 69-77.
33. Kamal A, Khamashta M. The efficacy of novel B cell biologics as the future of SLE treatment: a review. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 1094-101.
34. Hua F, Wilde B, Dolff S, et al. T-lymphocytes and disease mechanisms in Wegener's granulomatosis. *Kidney & blood pressure research* 2009; 32: 389-98.
35. Relle M, Fohr B, Fasola F, et al. Genetics and pathophysiology of granulomatosis with polyangiitis (GPA) and its main autoantigen proteinase 3. *Mol Cell Probes* 2016; 30: 366-73.
36. Fujimoto S, Watts RA, Kobayashi S, et al. Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the U.K. *Rheumatology (Oxford)* 2011; 50: 1916-20.
37. Koldingsnes W, Nossent HC. Epidemiology of ANCA associated vasculitis. *Norsk epidemiologi* 2008; 18: 37-48.

38. Chen M, Kallenberg CG. The environment, geoeidemiology and ANCA-associated vasculitides. *Autoimmun Rev* 2010; 9: A293-8.
39. de Lind van Wijngaarden RA, Hauer HA, Wolterbeek R, et al. Chances of renal recovery for dialysis-dependent ANCA-associated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2189-97.
40. Scott DG, Watts RA. Epidemiology and clinical features of systemic vasculitis. *Clin Exp Nephrol* 2013; 17: 607-10.
41. Hinze CH, Colbert RA. B-cell depletion in Wegener's granulomatosis. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2008; 34: 372-9.
42. Norsk elektronisk legehåndbok. Granulomatøs polyangiitt <https://legehandboka.no/handboken/kliniske-kapitler/revmatologi/tilstander-og-sykdommer/systemiske-inflammasjoner/granulomatos-polyangiitt-gpa/> (22.05.2017)
43. Singer O, McCune WJ. Update on maintenance therapy for granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Current Opinion in Rheumatology* 2017; 29: 248-53.
44. Boster, Antibody and ELISA experts. ELISA fundamental principle, how ELISA works <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle> (01.06.2016)
45. Thermo scientific. Blocking agent and detergent in ELISA <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/D19564.pdf> (15.08.2016)
46. R & D Systems. ELISA development guide [http://www.woongbee.com/0NewHome/RnD/ELISA\\_HA/Duaset\\_link/ELISA%20development%20guide.pdf](http://www.woongbee.com/0NewHome/RnD/ELISA_HA/Duaset_link/ELISA%20development%20guide.pdf) (15.08.2016)
47. Candor. Blocker selection [http://www.candor-bioscience.de/fileadmin/user\\_upload/blocker-selection.pdf](http://www.candor-bioscience.de/fileadmin/user_upload/blocker-selection.pdf) (10.08.2016)
48. R & D Systems. Human TGF-beta1 DuoSet ELISA <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dy240.pdf> (10.08.2016)
49. R & D Systems. Human IFN-gamma DuoSet ELISA [https://www.rndsystems.com/products/human-ifn-gamma-duoset-elisa\\_dy285#assay-procedure](https://www.rndsystems.com/products/human-ifn-gamma-duoset-elisa_dy285#assay-procedure) (10.08.2016)
50. Field A. *Discovering Statistics Using SPSS*, 4th edition. London: Sage Publications Ltd, 2013.
51. Bjørndal A, Hofoss D. *Statistikk for helse- og sosialfagene*. Oslo: Gyldendal akademisk, 2012.
52. Becker-Merok A, Eilertsen GØ, Nossent HC. Levels of Transforming Growth Factor- $\beta$  are low in Systemic lupus erythematosus patients with active disease. *The Journal of Rheumatology* 2010; 37: 2039-45.
53. Hrycek A, Janowska J, Cieslik P. Selected angiogenic cytokines in systemic lupus erythematosus patients. *Autoimmunity* 2009; 42: 459-66.
54. Ohtsuka K, Gray JD, Stimmler M. A Decreased production of TGF-beta by lymphocytes from patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 1998; 160: 2539-45.
55. Ohtsuka K, Gray JD, Stimmler M. The relationship between defects in lymphocyte production of transforming growth factor beta1 in systemic lupus erythematosus and disease activity or severity *Lupus* 1999; 8: 90-4.
56. Store medisinske leksikon. Polymorfisme <https://sml.sn�.no/polymorfisme> (29.05.2017)
57. Bidwell J, Keen L, Gallagher G. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases *Genes and Immunity* 1999; 1; 3-19

58. Wang BM, Kanagawa A, Nakamura S, et. al. Transforming growth factor beta 1 gene polymorphism in Japanese patients with Systemic Lupus Erythematosus *Kobe J Med Sci* 2007; 53: 15-23
59. Sayed S, Galal S, Herdan O, et al. A. Single nucleotide polymorphism T869C of Transforming growth factor-beta 1 gene and Systemic Lupus Erythematosus: Association with Disease Susceptibility and Lupus Nephritis *The Egyptian Journal of Immunology* 2014; 21: 9-21
60. Lu LY, Cheng HH, Sung PK. A Single-nucleotide polymorphisms of transforming growth factor beta1 gene in Taiwanese patients with systemic lupus erythematosus *J Microbiol Immunol Infect* 2003; 37: 145-52
61. Murakozy G, Gaede KI, Ruprecht B, et al. Gene polymorphisms of immunoregulatory cytokines and angiotensin-converting enzyme in Wegener's granulomatosis. *J Mol Med (Berl)* 2001; 79: 665-70.
62. Csernok E, Szymkowiak CH, Mistry N, et. al. Transforming growth factor-beta expression and interaction with proteinase 3 (PR3) in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis *Clinical and Experimental Immunology* 1996: 106; 104-11.
63. Trenova A, Manova M, Konstadinova I, et. al. Clinical and laboratory study of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in women with multiple sclerosis *Folia medica* 2011; 53: 29-53
64. Pandey N, Jain A, Garg RK, et al. Serum levels of IL-8, IFN $\gamma$ , IL-10, and TGF beta and their gene expression levels in severe and non-severe cases of dengue virus infection. *Arch Virol* 2015; 160: 1463-75.
65. Rethorst CD, Toups MS, Greer TL, et al. Pro-inflammatory cytokines as predictors of antidepressant effects of exercise in major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 2013; 18: 1119-24.
66. Harigai M, Kawamoto M, Hara M, et al. Excessive Production of IFN- $\gamma$  in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Its Contribution to Induction of B Lymphocyte Stimulator/B Cell-Activating Factor/TNF Ligand Superfamily-13B. *The Journal of Immunology* 2008; 181: 2211-9.
67. Gerez L, Shkolnik T, Hirschmann O. Hyperinducible expression of the interferon gamma gene and its suppression in systemic lupus erythematosus *Clin Exp Immunol* 1997: 109; 296-303
68. Spriewald BM, Witzke O, Wassmuth R, et al. Distinct tumour necrosis factor alpha, interferon gamma, interleukin 10, and cytotoxic T cell antigen 4 gene polymorphisms in disease occurrence and end stage renal disease in Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 457-61.
69. Komocsi A, Lamprecht P, Csernok E, et. al. Peripheral Blood and Granuloma CD4+ and CD28- T-cells are a major source of Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha in Wegener's Granulomatosis *American Journal of Pathology* 2002; 160: 2002
70. Csernok E, Trabandt A, Muller A, et. al. Cytokine profiles in Wegeners granulomatosis - predominance of Type 1 (Th1) in the Granulomatous Inflammation *Arthritis and Rheumatism* 1999; 42: 742-50.
71. Button KS, Ioannidis JP, Mokrysz C, et al. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14: 365-76.
72. CSH protocols. Tris-buffered saline (TBS)  
<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2009/6/pdb.rec11830.short> (15.08.2016)
73. CSH protocols. Phosphate-buffered saline (PBS)  
<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8247> (15.08.2016)

## 9 Vedlegg 1-5 (5 stk.): Sammendrag av kunnskapsevalueringer

<b>Referanse:</b> Lerang KG, T; Thelle, D. S; Gran J. T. Mortality and years of potential life loss in systemic lupus erythematosus: a population-based cohort study Lupus 2014: 1546-52.		<b>Design:</b> Kohorte	
		<b>Dokumentasjonsnivå</b>	II b
		<b>GRADE</b>	Moderat anbefaling ( <i>kommentar:</i> ingen randomisering, god konsistens, god appliserbarhet, lite data tilgjengelig).
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
Måle SLEs innvirkning på «years of potential life lost» (YPLL) for 60 års alder, undersøke dødsårsaker i en populasjonsbasert kohortestudie, sammenligne disse med den øvrige populasjonen.	Flere kilder ble benyttet for å identifisere 325 voksne pasienter (>16 år) med SLE bosatte i Oslo mellom 1999-2009 som oppfylte 4 eller flere ACR97-kriterier; databaser til sykehus i Oslo (5 stk.), pasienter inkl. i SLE-kohorten til Diakonhjemmet sykehus etabl. 1995, «Norwegian systemic connective tissue disease and vasculitis registry (NOSVAR)» ved Oslo Universitetssykehus, tall fra private revmatologer samt pasienter registrert med SLE som dødsårsak i Dødsårsaksregisteret.	5- og 10 års overlevelse var henholdsvis 95% og 90%, noe som er en signifikant reduksjon ift. den øvrige befolkningen. Totalt 50 SLE-pasienter døde ilt. studieperioden. Total SMR var 3,0 (95% KI 2,2-3,8). Den høyeste SMR var for kvinnelige pasienter mellom 16-39 år gamle. SLE-pasienter hadde 10 ganger høyere rate av YPLL60 sammenlignet med kontrollgruppen. Av alle SLE-pasientene som døde mens studien foregikk var gjennomsnittlig alder ved dødsfall 63 år, mens for de matchede kontrollene var den 77 år. Selv om de kvinnelige SLE-pasientene hadde en relativt god 10-års overlevelse (95% vs. 97% for kontrollene) døde en femtedel av SLE-pasientene før de var fylt 40 år gamle.	<b>Sjekkliste (kohorte):</b> <b>Var gruppene sammenliknbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer?</b> Ja; matchet for alder, kjønn, etnisitet. <b>Er gruppene rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe?</b> Ja. <b>Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon?</b> Tja; har inkludert alle med SLE bosatt i Oslo. <b>Var studien prospektiv?</b> Ja. <b>Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp?</b> Ideelt sett skulle man hatt flere dødsfall hos SLE-pasientene, spesielt menn. Men vanskelig siden det er en sjelden sykdom blant menn. <b>Er det utført frafallsanalyser?</b> Ja. <b>Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall?</b> 10 år, sannsynligvis ja. <b>Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/gjennomføring?</b> Mangler data. <b>Er den som vurderte resultatene (endepunktene) blindet gruppetilhørighet?</b> Nei? <b>Hva diskuterer forfatterne som.</b> <b>Styrke:</b> inklusjon av pasientene tidlig i sykdomsforløpet. <b>Svakhet:</b> lite antall dødsfall blant SLE-pasientene (spesielt menn), ingen sikker analytisk formel for enkel kalkulering av standardfeil og KI for YPLL, tidvis mangelfull informasjon på dødssertifikatene. <b>Viser forfatterne til annen litteratur som styrker/svekker resultatene?</b> Ja. <b>Har resultatene plausible biologiske forklaringer?</b> Ja; tidligere beskrevet at SLE-pasienter har høyere mortalitet enn friske.
Konklusjon	Overlevelse, standard mortalitetsrate (SMR), «years of potential life loss before 60 years of age» (YPLL60) og dødsårsak ble undersøkt og sammenlignet med en matchet kontrollpopulasjon. Pasientene ble tilfeldig tildelt fem kontroll-individer bosatte i Oslo, matchet for fødselsår, kjønn og foreldrenes etnisitet (def. som foreldres opprinnelsesland). Kun «inception cases», 127 stk. (fulgt siden diagnosetidspunkt) ble undersøkt for å kalkulere overlevelse. Tidspunkt for dødsfall og dødsårsak for SLE-pasientene og kontroller ble hentet fra Dødsårsaksregisteret, Statistisk sentralbyrå.		
Land	Norge		
År data innsamling	1999-2009		
	Analysen inkluderte underliggende, umiddelbare og bidragende dødsårsaker.		

<b>Referanse:</b> Lerang KG, I; Garen, T; Thelle, D. S; Gran J. T High incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus in Norway Lupus 2012 1362-9.		<b>Design:</b> Pasientserie	
		<b>Dokumentasjonsnivå:</b>	III
		<b>GRADE</b>	Moderat anbefaling ( <i>kommentar:</i> ingen randomisering, tatt hensyn til frafall, god konsistens, god appliserbarhet, god presisjon)
<b>Formål</b>	<b>Materiale og metode</b>	<b>Resultater</b>	<b>Diskusjon/kommentarer</b>
Å identifisere alle pasienter med systemisk lupus erythematosus (SLE) bosatte i Oslo fra 1999-2008, og estimere insidens og prevalens av SLE ift. alder, kjønn og etnisitet,	Inkludert i studien var voksne over 16 år bosatte i Oslo. Kun pasienter som oppfylte 4 eller flere av ACR97-kriteriene for SLE ble inkludert. De ble identifisert fra 5 ulike kilder; databasene til alle sykehusene i Oslo (5 stk.) med søk på ICD-10 kode SLE, pasienter inkludert i SLE-kohorten til Diakonhjemmet sykehus etabl. 1995, «Norwegian systemic connective tissue disease and vasculitis registry (NOSVAR)» ved Oslo Universitetssykehus, tall fra private reumatologer samt pasienter registrert med SLE som dødsårsak i Dødsårsaksregisteret, Statistisk sentralbyrå. De inkluderte ble fulgt fra 1999-2008.	Insidensen var stabil 9-års perioden, med en gjennomsnittlig årlig insidens på 3,0 pr. 100.000 i risiko (95% KI 2,4-3,5). Total prevalens var 52,8 pr. 100.000 innbyggere (95% KI 45,2-58,4) med 91,0 for kvinner og 10,7 for menn. Av 116 voksne som i denne 9-års perioden fikk SLE var 101 kvinner og 15 menn. Kvinner utviste et bimodalt mønster i aldersspesifikk insidens med første topp mellom 16-29 år, og den andre mellom 50-59 år. Kvinner mellom 16-39 år hadde en signifikant høyere insidens sammenlignet med kvinner eldre enn 60 år. Menn hadde høyest insidens mellom 50-59 år. Prevalensproporsjonene for europeiske etterkommere lignet asiatiske, men var signifikant lavere enn for individer adoptert fra ikke-europeiske land. Prevalens og insidens av SLE i denne studien (52,0 og 2,6) ligner tallene fra Nord-Norge (44,9-64,1 og 2,6-3,0).	<b>Sjekkliste:</b> <b>Var gruppene sammenliknbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer?</b> Mangler data. <b>Er gruppene rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe?</b> Ja; norske, voksne statsborgere. Tatt høyde for ulik etnisitet. <b>Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon?</b> Ja? <b>Var studien prospektiv?</b> Ja. <b>Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp?</b> Ja; forsøkt å få med absolutt alle med SLE bosatt i Oslo. <b>Er det utført frafallsanalyser?</b> Ja. 8 av 93 pasienter (9%) falt fra. <b>Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall?</b> Tja; for å estimere insidens og prevalens vil en 9-års periode gi mye informasjon. Dog vil man ikke kunne si noe om kausale sammenhenger ift. sykdomsutvikling og etnisitet/miljømessige faktorer. <b>Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/gjennomføring?</b> Mangler data. <b>Er den som vurderte resultatene (endepunktene) blindet gruppetilhørighet?</b> Nei. <b>Hva diskuterer forfatterne som.</b> <b>Styrke:</b> påviser insidens og prevalens i ulike etniske grupper, har inkludert pasienter fra 5 ulike kilder studert over flere år, har pålitelige konsensus-tall fra Norge. <b>Svakhet:</b> kan ha misst pasienter, spesielt mildere former for SLE. Men innhenting av informasjon fra flere kilder gjør dette mindre sannsynlig. <b>Viser forfatterne til annen litteratur som styrker/svekker resultatene?</b> Ja. <b>Har resultatene plausible biologiske forklaringer?</b> Det vet man ikke; ikke funnet spesifikke gener eller sikkert påviste miljømessige faktorer.
<b>Konklusjon</b>			
Funnene indikerer en høyere prevalens i Norge sammenlignet med kaukasiere i Danmark og England. Den høyere prevalensen av SLE hos adopterte bosatte i Norge fordrer ytterligere undersøkelser.			
<b>Land</b>			
Norge			
<b>År data innsamling</b>			
1999-2008			



<b>Referanse:</b> Murakozy G, Gaede KI, Ruprecht B, et al. Gene polymorphisms of immunoregulatory cytokines and angiotensin-converting enzyme in Wegener's granulomatosis. J Mol Med (Berl) 2001; 79: 665-70.		<b>Design:</b> Tverrsnittstudie	
		Dokumentasjonsnivå	III
		GRADE	Svak anbefaling ( <i>kommentar: ingen randomisering eller blinding, ikke samsvar ift. tidligere studier, lite presise resultater</i> ).
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
Undersøke om visse polymorfismer (genetisk variasjon) i genene som koder for angiotensin-converting enzyme (ACE), TGF- $\beta$ 1 og interleukin-10 (IL-10) opptrer med ulik frekvens hos pasienter med GPA ift. kontroller.	39 pasienter ved granulomatøs polyangiitt (GPA) var inkludert i studien (kaukasiere, 17 kvinner og 22 menn, gjennomsnittlig alder $54 \pm 2,1$ år). Kontrollgruppen bestod av 262 friske bloddonorer (kaukasiere, 173 kvinner og 89 menn, gjennomsnittlig alder $47,4 \pm 11,6$ år), rekruttert fra en rutine-helsesjekk i regi av bedriftshelsetjenesten. De inkluderte ble genotypet for polymorfismer i de nevnte genene (se «formål»).	IL-10 og TGF- $\beta$ 1 er immunregulerende cytokiner som kan nedregulere responsen til T-hjelperceller type 1. Man fant en trend mot at pasientene med GPA hadde genotyper assosiert med redusert frigjøring av IL-10 og TGF- $\beta$ 1, dog var funnene ikke-signifikante. Dette danner grunnlaget for hypotesen om at ulike immunregulerende cytokinmønstre, som følge av genpolymorfismer, kan være involvert i patogenesen ved GPA.	<b>Sjekkliste (tverrsnittstudie)</b> <b>Er problemstillingen klart formulert?</b> Ja. <b>Er en tverrsnittstudie velegnet metode for å besvare problemstillingen/spørsmålet?</b> Tja; en kohorte med utgangspunkt i en populasjon med aktuelle polymorfismer der man følger gruppen og ser hvor mange som utvikler sykdom ville kanskje kunne gitt mer informasjon ift. årsakssammenheng. Men GPA er en sjelden sykdom, og man kunne risikert å ikke inkludert akkurat de som ville utviklet sykdom. <b>Er befolkningen (populasjonen) som utvalget er tatt fra, klart definert?</b> Ja. <b>Ble utvalget inkludert i studien på en tilfredsstillende måte?</b> Ja. <b>Ble det redegjort for om respondentene skiller seg fra de som ikke har respondert? Er svarprosenten høy nok?</b> Ikke spørreundersøkelse. Ingen respondenter, ikke rapportert frafall. <b>Bruker studien målemetoder som er pålitelige for det som skal måles?</b> Ja. Men svakhet med studien at de ikke har målt cytokinnivåene. <b>Er datainnsamlingen standardisert?</b> Ja. <b>Er dataanalysen standardisert?</b> Ja. <b>Hva forteller resultatene?</b> Se «konklusjon». <b>Kan resultatene skyldes tilfeldigheter?</b> Ja; trenden som ble funnet var ikke signifikant. Men et utvalg på kun 39 pasienter ville det vært nødvendig med en stor forskjell for å få signifikant p-verdi. Dersom man hadde hatt et større utvalg ville forskjellene muligens vært signifikante. <b>Kan det overføres til praksis?</b> Tja, et bidrag til kartleggingen av cytokinenes rolle ift. autoimmun sykdom.
Konklusjon	Pasienter med GPA hadde i større grad enn friske genotyper assosiert med redusert frigjøring av IL-10 og TGF- $\beta$ 1, men funnene var ikke signifikante.		
Land	Tyskland		
År data innsamling	2001		

<b>Referanse:</b> Becker-Merok, A; Eilertsen, G. Ø; Nossent, J. C. Levels of Transforming Growth Factor- $\beta$ are low in Systemic lupus erythematosus patients with active disease. The Journal of Rheumatology, vol. 37 no. 10 (2010).		<b>Design:</b> Tverrsnittstudie	
		<b>Dokumentasjonsnivå:</b> III	
		<b>GRADE:</b> Moderat anbefaling (ingen randomisering, konsistens m. tidl. studier, utfall målt m. valide metoder, kun data fra enkeltcenter, homogen gr. pas.)	
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
<p>Cytokinenes rolle ved systemisk lupus erythematosus (SLE) er ikke fullstendig kartlagt. Studien undersøker en rekke inflammatoriske og immunmodulerende cytokiner for å bestemme deres verdi som biomarkører ved SLE.</p>	<p>102 pasienter med SLE (87% kvinner) var inkludert, kontrollgruppen besto av 31 voksne, friske frivillige (74% kvinner). Sirkulerende konsentrasjoner av interleukin 1<math>\beta</math> (IL-1<math>\beta</math>), IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1<math>\alpha</math>), MIP-1<math>\beta</math>, interferon <math>\gamma</math> (IFN-<math>\gamma</math>), tumor nekrosefaktor <math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>) og total transforming growth factor <math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>) ble målt i serum med «Sandwich-ELISA» metodikk. Dataene ble relatert til sykdomsaktivitet (SLE Disease Activity Index (SLEDAI), lymfocyt-tall, autoantistoff-nivåer, påløpt skade (Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR Damage Index; SDI), samt samtidig behandling.</p>	<p>Pasienter med SLE hadde lavere nivåer av TGF-<math>\beta</math>1 (<math>p = 0,01</math>) og IL-1<math>\beta</math> (<math>p = 0,0004</math>) sammenlignet med kontroller. TGF-<math>\beta</math>1 nivåene var lavere hos pasienter med SLEDAI-score 1-10 og SDI &gt; 3; og korrelerte med CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> -og natural killer celledetall. Dette var uavhengig av bruk av steroider eller cytotoxiske medikamenter. Behandling med kardiovaskulære medikamenter var assosiert med lavere nivåer av IL-12. Det fantes ingen konsekvente sykdomsassocisjoner for de andre undersøkte cytokinene.</p>	<p><b>Sjekkliste (tverrsnittstudie)</b>  <b>Er problemstillingen klart formulert?</b> Ja.  <b>Er en tverrsnittstudie velegnet metode for å besvare problemstillingen/spørsmålet?</b> Tja; velegnet for å finne prevalens samt ift. diagnostikk («hvordan finne ut om noen har problemet/sykdommen»). Men cytokiner er kortlevde proteiner, her undersøkt som ledd i kronisk sykdom. En longitudinell studie med multiple målinger kunne i så måte vært bedre.  <b>Er befolkningen (populasjonen) som utvalget er tatt fra, klart definert?</b> Ja; deltagere i Tromsø Lupus cohort, et populasjonsbasert longitudinelt register for SLE-pasienter i Nord-Norge. Finnes ikke informasjon om kontrollene utover antall, prosentandel kvinner, gjennomsnittlig alder og at de er «friske».  <b>Ble utvalget inkludert i studien på en tilfredsstillende måte?</b> Ja.  <b>Ble det redegjort for om respondentene skiller seg fra de som ikke har respondert?</b> Ikke en spørreundersøkelse; ingen «respondenter» i så måte.  <b>r svarprosenten høy nok?</b> Ingen spørreundersøkelse.  <b>Bruker studien målemetoder som er pålitelige for det som skal måles?</b> Ja.  <b>Er datainnsamlingen standardisert?</b> Ja.  <b>Er dataanalysen standardisert?</b> Ja.  <b>Kan resultatene skyldes tilfeldigheter?</b> Det er konsekvent oppgitt p-verdier. Oppgis ikke konfidensintervaller.  <b>Kan det overføres til praksis?</b> Ja, funnene viser oss at TGF-<math>\beta</math>1 kan være et interessant mål for å gjenopprette immunbalansen ved SLE.</p>
Konklusjon	<p>Lavere nivåer av TGF-<math>\beta</math>1 var den mest konsekvente cytokin-abnormaliteten hos pasienter med SLE. Assosiasjonen med sykdomsaktivitet, lymfocyt-tall og skade indikerer at TGF-<math>\beta</math>1 kan være et terapeutisk mål av interesse ved SLE.</p>		
Land	Norge		
År data innsamling	Ikke oppgitt når serumprøvene er tatt – artikkel publ. I 2010.		

<b>Referanse:</b> Nossent HC. Systemic lupus erythematosus in the Arctic region of Norway The Journal of Immunology 2001; 28: 539-46		<b>Design:</b> Historisk/retrospektiv kohorte	
		Dokumentasjonsnivå	II b
		GRADE	Moderat anbefaling ( <i>kommentar:</i> grei studiekvalitet, god konsistens og direkthet, god presisjon, ingen randomisering, ingen diskuterte svakheter).
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
Klinisk presentasjon ved SLE varierer geografisk, og er muligens relatert til lokale miljømessige faktorer. Studien beskriver insidens, prevalens og presentasjon av SLE i en kaukasisk populasjon eksponert for arktisk klima.	Det studerte området var de 2 nordligste fylkene i Nord-Norge (populasjon 222.403), hvor 4 sykehus har spesialisthelsetjenestefunksjon. Det finnes ingen revmatologisk avdeling. Det fantes ingen privatpraktiserende revmatologer i studieperioden. All serologisk testing av pasienter med mistenkte revmatiske sykdommer ble gjennomført ved Klinisk immunologisk laboratorium i Tromsø. Antinukleært antistoff (ANA) ble gjennomført med immunofluorescence fra 1978 til 1993, og med ELISA fra 1993. Kilder til pasientinformasjon var registre for innlagte pasienter og polikliniske konsultasjoner, samt mortalitetsdatabasen til Statistisk sentralbyrå. Det ble søkt i databasene for ICD-kodene for SLE, Sjøgrens syndrom, uklassifisert bindevevssykdom og diskoid lupus i perioden 1978-96. Kun pasientene som oppfylte 1982 ACR-kriteriene for SLE ble inkludert. Årlig insidens-rate ( <i>annual incidence rate</i> , AIR), punktprevalens (PP) og mortalitetsrater ble estimert pr. 100.000 i risiko.	Man fant 83 nye tilfeller av SLE ilt. studieperioden (87% kvinner, gjennomsnittlig alder 40,6 år ved diagnose). Årlig insidensrate for hele perioden var 2,6 (95% KI 1,9-2,9) for voksne. Dette ligner tall fra Danmark, England og USA: Kjønnsspesifikk AIR var 4,6 for kvinner og 0,6 for menn. AIR i den første og siste 9-års perioden var lik ( $p > 0,2$ ). Total punktprevalens for SLE 1. jan. 1996 var 44,9, og var høyest for kvinner mellom 31-49 år (PP 102,5). Mortalitet ved nye tilfeller var 9,6, med total 10-års overlevelse estimert til 75%. Alders- og kjønnsspesifikke mortalitetsrater samt standardiserte mortalitetsratioer indikerte en 2 ganger høyere risiko for død etter å ha fått diagnosen SLE. 5- og 10 års overlevelse for nye tilfeller fulgt fram til 1999 var henholdsvis 92% og 75%.	<b>Sjekkliste (kohorte):</b> <b>Var gruppene sammenliknbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer, Er gruppene rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe?</b> Ja. <b>Var studien prospektiv?</b> Nei. <b>Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig i de to gruppene?</b> Ja. <b>Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp?</b> Tja, det var «kun» 83 som fikk SLE, sanns funnet alle med denne diagnosen i landsdelen. <b>Er det utført frafallsanalyser?</b> Mangler data. <b>Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall?</b> Ja, i overkant av 18 år. <b>Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/gjennomføring?</b> Mangler data. <b>Er den som vurderte resultatene (endepunktene) blindet gruppetilhørighet?</b> Nei. <b>Hva diskuterer forfatterne som.</b> <b>Styrke:</b> 3 informasjonskilder, kun én analyse-lab, informert alle primærleger i regionen om studien, regulert offentlig helsetjeneste (ingen privatpraktiserende), lang oppfølging. <b>Svakhet:</b> Ingen spesielle. <b>Viser forfatterne til annen litteratur som styrker/svekker resultatene?</b> Ja.
Konklusjon			
Insidensen av SLE er forholdsvis lav og stabil i en kaukasisk populasjon eksponert for det arktiske klima. Utvikling og presentasjon av SLE er ikke ulik lignende populasjoner i den vestlige verden. SLE kan sees hos 1 pr. 1000 norske kvinner over 30 år.			
Land			
Norge			
År data innsamling			
1978-96 (publ. 2001)			

## 10 Vedlegg 6: Ordliste immunologiske begreper

**ACR:** American College of Rheumatology

**Adaptive immunforsvar:** utgjøres av B- og T-cellene. Gir forsterket immunsvaret mot inntrengere de har møtt tidligere, noe som gir en «immunologisk hukommelse».

**ANA:** antinukleære antistoffer, gruppe autoantistoffer rettet mot strukturer i cellekjernen. Del av diagnostikk ved SLE.

**ANCA:** anti-nøytrofilt cytoplasmatisk antistoff, rettet mot lysosomale enzymer i granulocytters granula. De deles inn i to undergrupper, cANCA (cytoplasmatisk) og pANCA (perinukleært). Dersom cANCA utgjøres av et antistoff rettet mot Proteinase 3 (PR3) er det sannsynlig at pasienten lider av GPA.

**Antigen:** stoff eller molekyl som har evne til å stimulere og aktivere kroppens immunsystem. Resultatet kan være produksjon av antistoffer\* eller aktivering T-lymfocytter\* som reagerer med deler av antigenet.

**Antigenpresenterende celle:** celle som bearbeider og «presenterer» antigenet for T-lymfocytene. Viktigste antigenpresenterende cellene er dendrittiske celler og makrofager.

**Antistoff:** samme som «immunglobulin».

**Autoantistoff:** immunglobulin/antistoff som virker på celler eller bestanddeler av celler i individet selv.

**Autokrin virkning:** celle produserer faktorer/molekyler som virker tilbake på produsentcellen selv.

**B-lymfocyt:** type lymfocyt som modnes ferdig i beinmargen (B for beinmarg). Kan utvikles videre til plasmaceller, som danner antistoffer.

**Cytotoksisk:** om et stoff eller påvirkning som skader en celle, eventuelt så alvorlig at cellen dør (i noen tilfeller ved at cellen løses opp; cytolyse).

**Dendrittisk celle:** celler med mange og lange utløpere, viktigste antigenpresenterende cellene i hud og lymfeknuter. Gjennom antigenpresentasjonen knytter de sammen det ikke-adaptive immunforsvar og det adaptive immunforsvar.

**Epigenetikk:** reversible endringer i gen-aktivitet uten strukturelle endringer i DNA-et.

**Ervervede immunforsvar:** samme som «adaptive immunforsvar».

**Fagocytose:** spesiell form for endocytose der materialet som cellen tar opp utgjøres av større partikler, f.eks. en bakterie. Spiller en viktig rolle i organismens kamp mot infeksjoner.

**Fagocyt:** celler med stor evne til fagocytose. Mennesket har to hovedtyper profesjonelle fagocytter: nøytrofile granulocytter og makrofager.

**Glomerulonefritt:** inflammasjon i glomeruli (nyrenes karnøster).

**Granulocyt:** gruppe leukocytter med mange korn i cytoplasma og uregelmessig, lappedelt cellekjerne. Del av ikke-adaptive immunforsvar. Tre typer: nøytrofile, eosinofile og basofile granulocytter.

**Granulom:** knuteformet ansamling av betennelsesceller (organisert i et fast mønster) og bindevev. Oppstår som reaksjon på fremmedlege, ofte ved kroniske betennelsestilstander. Sees blant annet ved tuberkulose, sarkoidose og granulomatøs polyangiitt.

**Ikke-adaptive immunforsvar:** medfødt forsvars- eller immunsystem som kommer tillegg til det adaptive immunsystemet. Omfatter komplementsystemet, fagocytter og NK-celler. Fungerer som «førstelinjeforsvar».

**Immunglobulin (Ig):** bestemt gruppe proteiner i blodet som virker som *antistoffer*. Produseres av plasmaceller (aktiverte B-celler) i lymfeknuter, milt og benmarg. Inndelt i fem klasser: IgG, IgA, IgM, IgD og IgE.

**Immunitet:** generell betegnelse på det å være immun og unngå å bli syk etter gjentatt smitte med en bestemt mikroorganisme.

**Komplementsystemet:** system av proteiner som aktiveres bl.a. av visse antigen-antistoffreaksjoner. Proteinene kan dannes mange steder i kroppen, først og fremst i leveren. Systemet består av 11 proteiner som betegnes C1q, C1r, C1s og C2–C9. Disse reagerer i en bestemt rekkefølge.

**Leukocytt:** fellesbetegnelse på hvite blodceller. Skiller mellom to hovedtyper: segmentkjernede granulocytter og mononukleære celler (lymfocytter og monocytter).

**Lymfocytt:** undergruppe av hvite blodceller (leukocytter). Hovedansvarlige for kroppens evne til å beskytte seg selv mot kroppsfremmede inntrengere som for eksempel bakterier og virus, kalles derfor de immunkompetente cellene i immunsystemet.

**Makrofag:** stor «etecelle» (fagocytt) som har viktige renovasjons- og forsvarsfunksjoner i organismen. Dannes fra monocytene (type hvit blodcelle).

**Medfødte immunforsvar:** samme som «ikke-adaptive immunforsvar».

**Monocytt:** type leukocytt, fungerer som fagocytter som opptar og bryter ned bakterier og andre fremmedlegemer. Når monocytene går fra blod til vev, går de fra å være monocytter til å bli makrofager.

**NK-celle:** del av det medfødte immunforsvaret. Dreper (virker cytotoxisk på) spesielle svulstceller uten forutgående immunisering.

**Parakrin virkning:** celle produserer faktorer/molekyler som virker på nærliggende naboceller.

**Plasmacelle:** utvikles fra B-lymfocytter. Produserer og utskiller antistoffer.

**PR3 (proteinase 3):** enzym som uttrykkes i nøytrofile granulocytter. Målet til ANCA i c-ANCA subtypen (cytoplasmisk), et autoantistoff som ofte sees ved granulomatøs polyangiitt.

**Thymus:** lappet lymfoepitelialt organ bak brystbenet; hovedorgan i immunsystemet og modningssted for T-celler. Regnes som lymfatisk vev.

**T-lymfocytt:** type lymfocytt som modnes ferdig i thymus (T for thymus). Tre ulike hovedtyper: cytotoxiske T-celler (Tc-celler), T-hjelperceller (Th-celler) og regulatoriske T-celler (Treg-celler). Ansvarlige for den cellulære immuniteten, altså immuniteten som formidles av immunsystemets celler.

## 11 Vedlegg 7: Ordliste statistiske begreper

**Alternativ hypotese ( $H_1$ ):** Hypotese om at en årsak og en virkning er tilstede.

**Avhengig variabel:** Effekt, utfall. Avhenger av prediktor.

**Binære variabler:** Kun to kategorier, f.eks. «død eller levende»

**Diskrete/diskontinuerlige variabler:** Som regel tellinger av hendelser eller frekvenser.

**Effektstørrelse:** Objektivt (og vanligvis) standardisert mål på hvor uttalt eller markant en forskjell eller sammenheng er. Størrelsen på et utfall. Eks. Cohens  $d$ , Pearsons korrelasjonskoeffisient  $r$ , odds ratio (OR).

**Eksperimentell studie:** Manipulerer en variabel (prediktor) for å sjekke om det påvirker andre variabler.

**Frekvensfordeling/histogram:** Graf med verdiene til observasjonene på x-aksen, og frekvensen til observasjonene på y-aksen.

**Frihetsgrader ( $df$ ):** Antallet observasjoner som er frie til å variere. Hvis en parameter holdes konstant vil antallet frihetsgrader være *en mindre* enn det antallet brukt til å kalkulere parameteren. Skrives  $N - 1$ .

**Intervallnivå:** Variablene er organisert slik at avstanden mellom verdiene er konstant. Eks. temperaturskalaen.

**Konfidensintervall:** Gir en nedre og en øvre grense for størrelsen som estimeres, og lengden av intervallet antyder hvor godt estimatet er (et langt intervall signaliserer større usikkerhet enn et kort). Vi bestemmer et intervall som med en viss grad av sikkerhet (eks. 95 %) inneholder den ukjente størrelsen. Gjennomsnittet er alltid i sentrum av konfidensintervallet.

**Kontinuerende variabler:** Faller innenfor en uavbrutt skala. Eks. vekt –og lengdeenheter.

**Median:** Midterste score når scorene er satt i stigende rekkefølge. Rel. uaffisert av ekstreme scorere. Kan brukes både på ordinale variabler og intervallvariabler.

**Middeltall:** Gjennomsnitt.

**Modus:** Den score som opptrer oftest i datasettet. Problem at kan omfatte flere verdier. Kan også påvirkes kun av et lite antall scorere dersom antallet av visse scorere er veldig like.

**Målenivå:** Uttrykk for hvor nyansert og detaljert informasjon variabelen gir, samt hvilke metoder som kan brukes i analyser av denne. Inkl. nominal-, ordinalt -og intervallnivå.

**NHST:** Null-hypotese signifikanstesting.

**Nominalt nivå:** Av «nomen» (navn). Observasjonsenheter er gruppert under forskjellige navneverdier. Eks. diagnose, kjønn. Hver kategori må være godt definert og gjensidig utelukkende.

**Normalfordeling:** Dataene i et histogram vil være fordelt langs x-aksen i en «klokkeform» - det vil være flest observasjoner i sentrum. Mange ting som oppstår naturlig har denne fordelingen, eks. høyde.

**Null-hypotese ( $H_0$ ):** Motsatte av en alternativ hypotese, sier vanligvis at en årsak og en virkning ikke er tilstede.

**Observasjonell studie:** Samler informasjon om større eller mindre gruppe mennesker uten å påvirke dem, observerer hva som skjer naturlig uten å gripe inn.

**Ordinalt nivå:** Av «orden». Innebygd gradient innebygd, kategoriene kan ordnes i en rekkefølge. Eks. en premieliste.

**Parametre:** Estimeres fra data vi har (i stedet for å måles eksakt) og er vanligvis konstanter vi tror representerer en sannhet om relasjonen mellom variablene i modellen. Eks. gjennomsnitt, median, korrelasjonskoeffisienten.

**Populasjon:** Gruppe man ønsker å undersøke. Kan være veldig generell (f.eks. alle mennesker), eller veldig snever.

**Ratio-variabler:** samme som intervall-variabler, men ratioen til scorene på skalaen må også gi mening. Eks. betyr en score på 16 på en angst-skala at personen har dobbelt så mye angst som en person med en score på 8.

**Reliabilitet:** Hvorvidt et instrument kan brukes konsekvent i ulike situasjoner, og gi de samme resultatene.

**Sentralgrenseteoremet:** ved store utvalg (vanligvis større enn 30) vil vi se en normalfordeling av data, der gjennomsnittet er likt gjennomsnittet i populasjonen (ved små utvalg vil vi ikke se en normalfordeling, men en *t-fordeling*).

**Standardavvik:** Spredningsmål i en fordeling av scorer, basert på sammenligning med gjennomsnittet. Kan kun benyttes på intervalldata, pga. at det kun er på dette målenivået man beregner gjennomsnitt.

**Standardfeil:** Et mål på hvor sannsynlig det er at en sample er representativ for hele populasjonen. En stor standardfeil betyr at det er stor variasjon mellom gjennomsnittene i de ulike samples, og de er derfor nødvendigvis ikke representative for populasjonen. En liten standardfeil betyr at gjennomsnittet vi har funnet sannsynligvis er representativt for hele populasjonen.

**Statistikktest:** Statistisk metode man bruker for å teste om det er signifikant forskjell mellom to datasett.

**Systematisk variasjon:** Variasjon som skyldes at den som utfører eksperimentet gjør noe i en setting, noe annet i en annen setting, eksperimentell manipulering. Mål på «virkning».

**Type I-feil:** Tror at det er et utslag mens det i realiteten ikke er det.

**Type II-feil:** Tror det ikke er noe utslag mens det i realiteten er det.

**Uavhengig variabel:** Årsak, prediktor. Avhenger ikke av andre variabler.

**Usystematisk/stokastisk variasjon:** Variasjon som skyldes tilfeldige variasjoner mellom de eksperimentelle settingene (eks. tid på dagen). Bør holdes til et minimum. Mål på «feil».

**Utvalg:** Mindre gruppe som representerer en populasjon. Benyttes ved statistiske målinger ettersom man sjeldent/aldri har tilgang til alle i en populasjon.

**Validitet:** Hvorvidt et instrument faktisk måler det det gir seg ut for å måle.

**Variabler:** «Ting som kan variere». Mellom folk (IQ), steder (arbeidsledighet), tid (antall cancerøse celler). De fleste hypoteser presenteres som to variabler: en forventet årsak og en forventet effekt. Disse vil variere med hverandre.

## 12 Vedlegg 8: Ordliste laboratorierelaterte begreper

**96-brønns mikropate:** reaksjonsbrett, har 96 adskilte kamre («brønner») med flat bunn. Designet spesifikt for bruk til ELISA.

**Adhesive strip:** klebrig plastikkark for beskyttelse av plate

**Analytt:** molekylet som måles

**Autowasher:** elektronisk vaskemaskin til mikropate

**Blocking:** bruk av en reagent til å binde uspesifikt til ELISA-plate

**BSA:** bovine serum albumin, mye brukt bærerprotein

**Capture antibody:** primært antistoff som 96-brønnsplaten bekles med, skal fange analytt

**Detection antibody:** sekundært antistoff, skal fungere som bindingssete for streptavidin-HRP

**NGS:** natural goat serum

**PBS:** phosphate-buffered saline

**Reagent diluent (RD):** fortynner

**Standard:** definert, kalibrert prøve av analytt. Brukes til å sette opp en kurve av kjente mengder som mengden i ukjent prøve analytt kan måles opp mot

**Stop solution:** løsning som stopper den enzymatiske reaksjonen i deteksjonssystemet

**Streptavidin-HRP:** streptavidin-protein som er kovalent konjugert til horseradish peroxidase-enzymet (HRP). Det konjugerte HRP gir enzymaktivitet for deteksjon ved bruk av riktig substratsystem

**Substrate solution:** løsning med substans som spaltes av aktuelt enzym, med fargeendring som resultat.

**TBS:** tris-buffered saline

**Wash solution:** løsning til vask av mikropate



## 13 Vedlegg 9: ELISA protokoll IFN-gamma

DuoSet Human IFN-gamma, 5 plate, *R&D Systems*

Catalog number: DY285-05

Forberedelse av reagenser i kit:

<b>Reagent</b>	<b>Mengde pr. rør</b>	<b>Arbeids- konsentrasjon</b>	<b>Blandes med:</b>	<b>Blandingsforhold</b>
<i>Capture antibody</i> Mouse anti- human IFN- $\gamma$ antibody	480 $\mu\text{g/mL}$	4,0 $\mu\text{g/mL}$	PBS	
<i>Detection antibody</i> Biotinylated goat anti- human IFN- $\gamma$ detection antibody	12 $\mu\text{g/mL}$	200 $\text{ng/mL}$	RD med NGS	
<i>Standard</i> Recombinant human IFN- $\gamma$	55 $\text{ng/mL}$	To-fold fortynningsrekke i 7 steg*	RD	
<i>Streptavidin- HRP</i>	2,0 mL		RD	1:40

Alle vask gjennomføres med automatisk vask, *Wellwash 4 MK 2 (Thermo)*.

Avlesning av optisk tetthet gjennomføres med mikroplate-avleser *Multiscan ascent (thermo)*

og dataprogram *Ascent Software Version 2.6*.

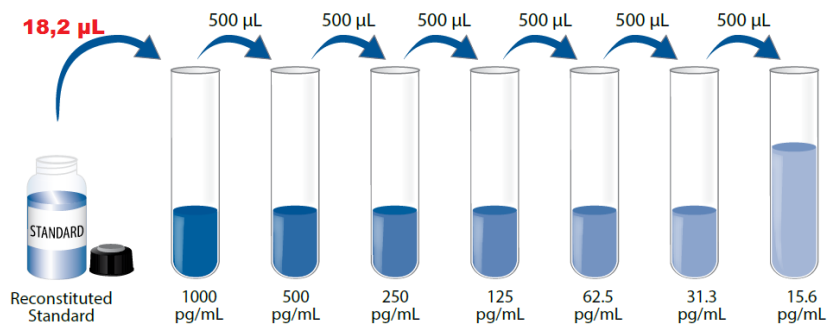
- 1) Fortynn *capture antibody* til arbeidskonsentrasjon i PBS:  
➔ *Arbeidskonsentrasjon*: 100  $\mu\text{L}$  mouse antihuman IFN-antibody (capture antibody)  
+ 12 mL PBS

Umiddelbart bekle en 96-brønns mikroplate med 100  $\mu\text{L}$  pr. brønn av fortynnet *capture antibody*.

Forsegl platen med adhesive strip og *inkuber over natta* i romtemperatur.

Neste dag:

- 2) Lage *wash solution* til bruk i autowasher:  
➔ 40 ml WASH (WA 126) + 1000 mL  $\text{H}_2\text{O}$
- 3) Lage *blocking* i et forhold 1:10:  
➔ 5 mL reagent diluent (RD) + 45 mL  $\text{H}_2\text{O}$
- 4) Gjennomfør totalt tre vask (autowasher).  
Fullstendig fjerning av væske i hvert steg er essensielt for korrekt utfall. Etter den siste vasken, fjern gjenværende wash buffer ved å snu og bank plata mot rent papir.
- 5) Blokker plata ved å tilsette 300  $\mu\text{L}$  *block buffer* til hver brønn.  
Dekk med adhesive strip og *inkuber i minimum 1 time* i romtemperatur.
- 6) Bland reagent diluent med TBS for totalt 25 mL:  
➔ 24,73 mL TBS + 250  $\mu\text{L}$  RD + 12,5  $\mu\text{L}$  Tween 20 (detergent)  
(12 mL av RD med TBS + 200  $\mu\text{L}$  NGS skal brukes til detection antibody, 1000  $\mu\text{L}$  RD med TBS skal brukes til standard fortynning)
- 7) Lage standard fortynning:  
➔ 18,2  $\mu\text{L}$  standard + 1000  $\mu\text{L}$  RD med TBS (1000 pg/mL), og fortsetter videre med en to-folds tortynningerekke inntil man når en konsentrasjon på 15,6 pg/mL (6 steg).



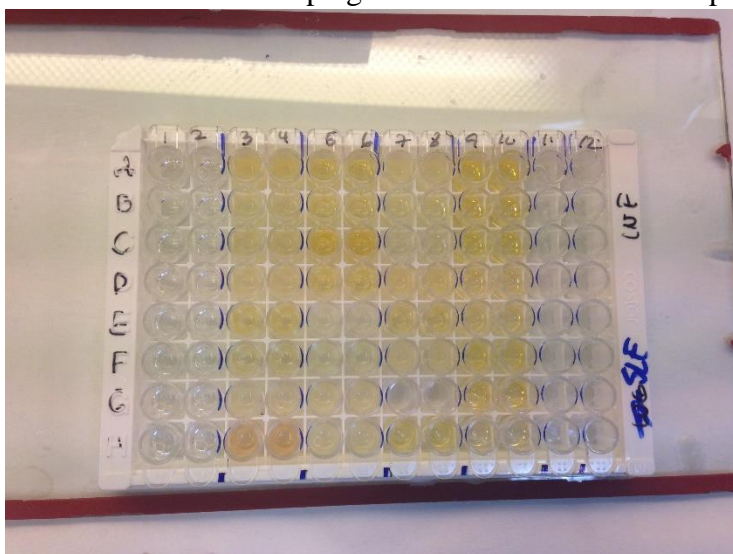
Vi benytter en to-folds fortynningsrekke, som reduserer konsentrasjonen av en original løsning med en halv (faktor to-reduksjon).

8) Programmere *Ascent Software*

Etter 1 time:

9) Vaske plata

10) Tilsette 100 µL standard og 100 µL serum (SLE/WG/kontroller) til 96-brønnsplata. Dekk med adhesive strip og inkuber i 2 timer i romtemperatur.



Figur 12 96-brønns plate med standard i A-H 1 og 2, og serumprøver i A-H 3-12.

Foto: Maria Olsen Fossmark

Etter 2 timer:

11) Vaske plata

12) Tilsett 100  $\mu\text{L}$  av *detection antibody*, fortynnet med reagent diluent med NGS (se over), til hver brønn.

Dekk med en adhesive strip og *inkuber i 2 timer* i romtemperatur.

Etter 2 timer:

13) Vaske plata

14) Tilsett 100  $\mu\text{L}$  arbeidsfortynnet *streptavidin-HRP* til hver brønn.

➔ 300  $\mu\text{L}$  streptavidin-HRP + 12 mL RD (forhold 1:10).

Dekk plata og *inkuber i 20 minutter* i romtemperatur. Unngå å plassere platen i direkte lys.

Etter 20 minutter:

15) Vaske plata

16) Tilsette 100  $\mu\text{L}$  *Substrate Solution* (A+B).

*Inkuber i 20 minutter* i romtemperatur.

Etter 20 minutter:

17) Tilsette 50  $\mu\text{L}$  *Stop Solution* til hver brønn. Bank forsiktig på platen for å sikre tilstrekkelig blanding.



*Figur 13 96-brønns plate etter tilsatt stop solution*

Foto: Maria Olsen Fossmark

18) Avlesning; bestem den optiske tettheten av hver brønn umiddelbart ved bruk av en mikroplate-avleser satt på 450 nm (49).

## 14 Vedlegg 10: ELISA protokoll TGF-beta1

Human TGF-beta 1 DuoSet, 5 plate, *R&D Systems*

Catalog number: DY240-05

Lot: 326326

Forberedelse av reagenser i kit:

<b>Reagent</b>	<b>Mengde pr. rør</b>	<b>Arbeids-konsentrasjon</b>	<b>Blandes med:</b>	<b>Blandingsforhold</b>
<i>Capture antibody</i> Human TGF- $\beta$ 1 capture antibody	120 $\mu$ g	2,0 $\mu$ g/mL	PBS	
<i>Detection antibody</i> Human TGF- $\beta$ 1 detection antibody	18,0 $\mu$ g	300 ng/mL	RD med PBS +Tween	
<i>Standard</i> Human TGF- $\beta$ 1 standard	90,0 ng	31,2-2000 pg/mL	RD med PBS +Tween	
<i>Streptavidin-HRP</i>	2,0 mL	1:40	RD (1:10 i H <sub>2</sub> O)	

Alle vask gjennomføres med automatisk vask, *Wellwash 4 MK 2 (Thermo)*.

Avlesning av optisk tetthet gjennomføres med mikroplate-avleser *Multiscan ascent (thermo)* og dataprogram *Ascent Software Version 2.6*.

1. *Activating:*

→ 40 µL serum + 20 µL 1N HCl. Mix, inkuber i 10 min. i romtemperatur.

Tilsett 20 µL av 1N NaOH/0,5 M HEPES. Mix.

I forkant av undersøkelse, bland 20 µL *activated sample* med 190 µL RD/PBS (fortynning).

2. Fortynn *capture antibody* til arbeidskonsentrasjon i PBS:

→ *Arbeidskonsentrasjon:* 2,0 µg/mL (100 µL Cap AB + 12 ml PBS)

Umiddelbart bekle en 96-brønns mikroplate med 100 µL pr. brønn av fortynnet *capture antibody*.

Forsegl platen med adhesive strip og *inkuber over natta* i romtemperatur.

Neste dag:

3. Lage *wash solution* til bruk i autowasher:

→ 40 ml WASH (WA 126) + 1000 mL H<sub>2</sub>O

4. Lage *blocking* (5% tween/PBS):

→ 1,5 mL Tween + 30 mL PBS (300 µg pr. brønn).

5. Gjennomfør totalt tre vask (autowasher).

Fullstendig fjerning av væske i hvert steg er essensielt for korrekt utfall. Etter den siste vasken, fjern gjenværende wash buffer ved å snu og bank plata mot rent papir.

6. Blokker plata ved å tilsette 300 µL *block buffer* til hver brønn.

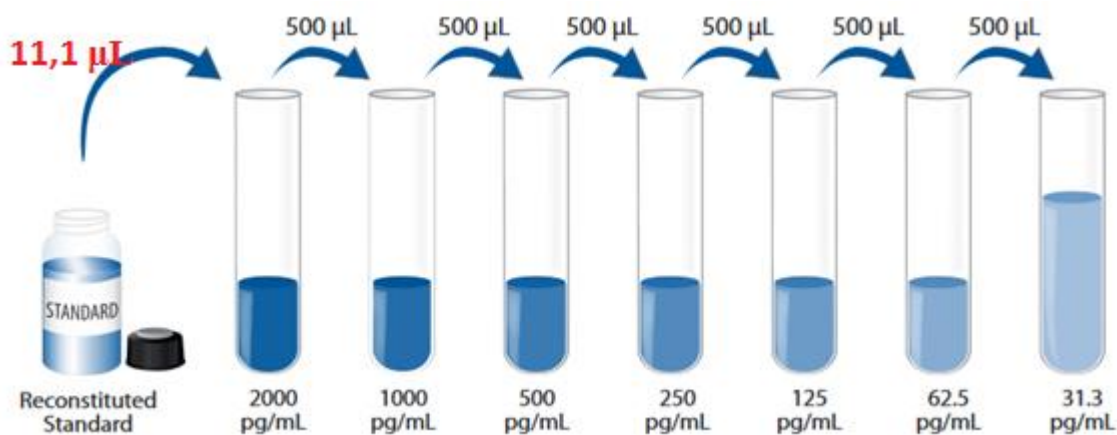
Dekk med adhesive strip og *inkuber i minimum 1 time* i romtemperatur.

7. Bland reagent diluent med PBS og Tween for totalt 40 mL:

→ 39,2 mL PBS + 560 µL RD (DY997) + 20 µL Tween  
(12 mL skal brukes til detection-AB).

8. Lage standard fortynning:

- 11,1  $\mu\text{L}$  standard + 1000  $\mu\text{L}$  RD med PBS (2000  $\text{pg/mL}$ ), og fortsetter videre med en to-folds fortynningerekke inntil man når en konsentrasjon på 31,3  $\text{pg/mL}$  (6 steg).



Vi benytter en to-folds fortynningsrekke, som reduserer konsentrasjonen av en original løsning med en halv (faktor to-reduksjon).

#### 9. Programmere *Ascent Software*

Etter 1 time:

10. Vaske plata

11. Tilsette 100  $\mu\text{L}$  standard og 100  $\mu\text{L}$  serum (SLE/WG/kontroller) til 96-brønnsplata.  
Dekk med adhesive strip og *inkuber i 2 timer* i romtemperatur.

Etter 2 timer:

12. Vaske plata

13. Tilsett 100  $\mu\text{L}$  av *detection antibody*, fortynnet med reagent diluent med PBS (200  $\mu\text{L}$  detection-AB + 12 mL RD/PBS), til hver brønn.  
Dekk med en adhesive strip og *inkuber i 2 timer* i romtemperatur.

Etter 2 timer:



14. Vaske plata

15. Tilsett 100  $\mu\text{L}$  arbeidsfortynnet *streptavidin-HRP* til hver brønn.

➔ 300  $\mu\text{L}$  streptavidin-HRP + 12 mL RD (forhold 1:10).

Dekk plata og *inkuber i 20 minutter* i romtemperatur. Unngå å plassere platen i direkte lys.

Etter 20 minutter:

16. Vaske plata

17. Tilsette 100  $\mu\text{L}$  *Substrate Solution* (A+B) (lages innen 15 min. før bruk).

*Inkuber i 20 minutter* i romtemperatur.

Etter 20 minutter:

18. Tilsette 50  $\mu\text{L}$  *Stop Solution* til hver brønn.

19. Avlesning; bestem den optiske tettheten av hver brønn umiddelbart ved bruk av en mikroplate-avleser satt på 450 nm. (48)

## 15 Vedlegg 11: Oppskrift tris-buffered saline og phosphate-buffered saline

### Tris-buffered saline (TBS) (1X)

50 mM Tris-Cl, pH 7.5

150 mM NaCl

To prepare, dissolve 6.05 g Tris and 8.76 g NaCl in 800 mL of H<sub>2</sub>O. Adjust pH to 7.5 with 1 M HCl and make volume up to 1 L with H<sub>2</sub>O. TBS is stable at 4°C for 3 mo. (72).

### Phosphate-buffered saline (PBS)

Reagent	Amount to add (for 1× solution)	Final concentration (1×)	Amount to add (for 10× stock)	Final concentration (10×)
NaCl	8 g	137 mM	80 g	1.37 M
KCl	0.2 g	2.7 mM	2 g	27 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g	10 mM	14.4 g	100 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g	1.8 mM	2.4 g	18 mM

<b>Reagent</b>	<b>Amount to add (for 1× solution)</b>	<b>Final concentration (1×)</b>	<b>Amount to add (for 10× stock)</b>	<b>Final concentration (10×)</b>
----------------	--	---------------------------------	--------------------------------------	----------------------------------

If necessary, PBS may be supplemented with the following:

CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.133 g	1 mm	1.33 g	10 mm
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0.10 g	0.5 mm	1.0 g	5 mm

PBS can be made as a 1× solution or as a 10× stock. To prepare 1 L of either 1× or 10× PBS, dissolve the reagents listed above in 800 mL of H<sub>2</sub>O. Adjust the pH to 7.4 (or 7.2, if required) with HCl, and then add H<sub>2</sub>O to 1 L. Dispense the solution into aliquots and sterilize them by autoclaving for 20 min at 15 psi (1.05 kg/cm<sup>2</sup>) on liquid cycle or by filter sterilization. Store PBS at room temperature (73).