

**Systemisk lupus erytematosus: økte serumnivå av  
cytokinene APRIL, TRAIL og BAFF hos SLE-  
pasienter i Nord-Norge.**

**5. årsoppgave i Stadium IV- Profesjonsstudiet i medisin ved  
Universitetet i Tromsø.**

**Ingunn M. Gundersen og Iren Eide Helland, MK-07**

**Veileder: Gro Østli Eilertsen, Førsteamanuensis  
Ben- og ledd forskningsgruppe, IKM, UIT**

**Tromsø, mai 2012.**

## **Innholdsfortegnelse:**

<b>Sammendrag</b> .....	<b>2</b>
<b>Systemisk lupus erytematosus (SLE):</b> .....	<b>4</b>
Epidemiologi: .....	4
Etiologi:.....	5
Immunologi:.....	5
Patogenese: .....	8
Klinikk og organmanifestasjoner ved SLE.....	9
Diagnose: .....	13
Behandling av SLE .....	14
Prognose: .....	16
Cytokinet BAFF .....	17
Cytokinet APRIL.....	17
Cytokinet TRAIL.....	19
<b>Metode:</b> .....	<b>19</b>
Statistiske metoder .....	20
<b>Resultater:</b> .....	<b>21</b>
Informasjon om utvalgene:.....	21
Analyse av cytokinene APRIL, TRAIL og BAFF. ....	22
S-konsentrasjon av cytokiner hos kvinner og menn med SLE.....	25
S-konsentrasjon av cytokiner hos pasienter med og uten lupus nefritt (LN). .....	25
Korrelasjon mellom serum konsentrasjoner av cytokiner og sirkulerende faktorer hos pasienter med SLE .....	26
Assosiasjon mellom s-konsentrasjon av cytokiner og autoantistoffer. .....	26
<b>Diskusjon</b> .....	<b>27</b>
<b>Referanser:</b> .....	<b>29</b>
<b>Appendix 1</b> .....	<b>32</b>
ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays).....	32
Analyse av s-APRIL .....	33
Analyse av s-TRAIL .....	35
<b>Appendix 2</b> .....	<b>37</b>

## Sammendrag

### Bakgrunn:

Systemisk lupus erytematosus (SLE) er en autoimmun multiorgansykdom med komplisert og ikke fullstendig kartlagt patogenese. Pasientene har mange ulike symptomer, som gjør sykdommen vanskelig å diagnostisere både i primær- og spesialisthelsetjenesten. Cytokiner har en avgjørende rolle i dysregulering av celler og en viktig faktor ved lokal organskade. Tidligere studier har vist høye serumnivåer av ulike inflammatoriske cytokiner ved SLE, og det forskes på medikamenter som hemmer cytokiner. Vi ville derfor se om det var forskjell i serumkonsentrasjonene av cytokinene BAFF, APRIL og TRAIL hos lupuspasienter i Nord-Norge og friske kontroller. Vi ville også undersøke om det var korrelasjon mellom disse cytokinene og se etter assosiasjon mellom cytokinene og andre sykdomsfaktorer hos lupuspasienter. For å få en helhetlig forståelse av SLE, har vi også fordypet oss i de kliniske aspekter ved sykdommen.

### Metode:

Oppgaven er en kaususkontroll studie. Vi har analysert serumprøver fra 100 lupuspasienter og 30 friske kontroller. Cytokinene APRIL, TRAIL og BAFF ble kvantifisert i serum ved hjelp av ELISA. Dataprogrammet SPSS statistics v19 ble brukt til statistiske beregninger.

### Resultat:

Alle de tre cytokinene APRIL, TRAIL og BAFF hadde en signifikant høyere konsentrasjon hos SLE pasientene sammenlignet med de friske kontrollene. APRIL konsentrasjonen hos SLE pasienter var 477,9 pg/ml mot 0,00 pg/ml hos kontroller, ( $p=0,015$ ). TRAIL konsentrasjonen hos SLE pasienter var 87,83 pg/ml mot 34,18 pg/ml hos kontroller, ( $p=0,044$ ). BAFF

konsentrasjonen hos SLE pasienter var 1,73 ng/ml mot 0,98 ng/ml hos kontroller, ( $p < 0,001$ ). Vi fant inverse korrelasjoner mellom APRIL og TRAIL ( $R = -0,55$ ,  $p < 0,01$ ), og TRAIL og BAFF ( $R = -0,20$ ,  $p < 0,05$ ).

Konklusjon:

Våre funn bekrefter at cytokinene har en viktig rolle ved SLE. Det var ingen klare korrelasjoner mellom cytokinene, noe som tyder på at de sannsynligvis har ulike roller. Cytokinenes spesifikke rolle i SLE patogenesen er fortsatt ikke fullstendig kjent.

## **Systemisk lupus erytematosus (SLE):**

Systemisk lupus erytematosus er en kronisk autoimmun sykdom som kan angripe mange forskjellige organsystemer. Etiologien for SLE er ukjent, men multiple faktorer som miljøfaktorer, medikamenter og genetisk disposisjon kan bidra til utvikling av denne sykdommen. Ved SLE oppstår det en svikt i selv-toleransen til immunsystemet. Immunsystemet oppfatter komponenter i egen organisme som fremmede, og det fører til en inflammasjon som resulterer i at kroppen starter å produsere antistoffer mot bestemte deler av egne celler og vev. En slik forekomst av antistoffer mot kroppsegne proteiner er et av kjennetegnene til SLE, og ulike typer autoantistoff og konsentrasjon i blodet kan fortelle om alvorlighetsgrad av sykdommen og hvilke organer som er angrepet. Produksjonen av autoantistoffer mot kjerneantigener er særlig uttalt ved SLE, og pasientene har ofte immunkomplekser bestående av autoantistoffer og kjerneantigener. Disse sirkulerer i blodbanen og kan slå seg ned i ulike organer. De patofysiologiske resultatene av dette er vaskulitt og trombose. SLE kan affisere flere organsystemer, pasientens symptomer er avhengige av hvilke organ som rammes. De organene som vanligvis rammes er hud, ledd, nyre, serøse hinner og CNS.

### **Epidemiologi:**

I Norge er punktprevalens 103 per 100.000. Insidensen i Norge er 4,6 per 100.000 kvinner og 0,6 per 100.000 menn[1]. Forekomsten er hyppigst blant nordamerikanske negresser, med en insidens på 215 per 100.000 [2]. 90% av de rammede er kvinner, og risiko for å utvikle sykdommen hyppigst i alderen 25-35 år. Men sykdomsdebut ses i alle aldere, også hos barn, ungdom og eldre.

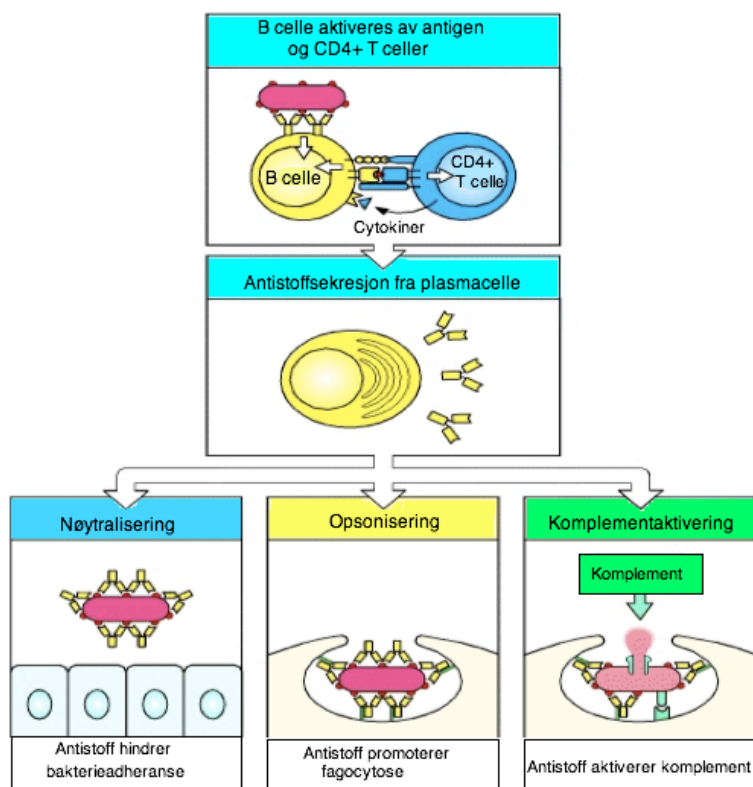
## **Etiologi:**

Etiologien for SLE er ukjent, men kombinasjonen av miljøfaktorer og genetisk disposisjon står sentralt. Det er påvist flere predisponerende genetiske faktorer som er assosiert til utvikling av SLE. Det er en høyere konkordans mellom monozygote tvillinger (ca. 25%) sammenlignet med dizygot tvillinger (ca. 3%) [3]. I tillegg er flere forskjellige kromosområder blitt identifisert med gener som er linket mot utvikling av SLE, blant annet HLA-genene A1, B8 og DR3. Homozygote defekter i komplementgenene C1q, C2 eller C4 gir også en økt risiko for utvikling av SLE. Kjønnshormon status kan i tillegg være en faktor da fertile kvinner er hyppig affisert, og hormonterapi med østrogen gir økt risiko for utvikling av SLE. Faktorer som sollys og medikamentbruk kan bidra til sykdomsutviklingen og utløse sykdomsaktivitet. De mest aktuelle medikamentene som kan utløse sykdomsaktivitet er hydralazine, isoniazide, procainamide, acebutolol, labetalol, methyldopa, cabamazepine, phenitoin, lithium, D-penicillamine, propylthiouracil. Ulike virus der det mest kjente er Epstein-Barr virus, har blitt vurdert som en utløsende faktor av sykdommen. [4]

## **Immunologi [5] :**

Immunforsvaret er en organisasjon av celler og molekyler med spesielle funksjoner som forsvarer oss mot infeksjoner og tumorutvikling. Infeksiøse agens som bakterier, virus og sopp forsøker stadig å invadere kroppen. Immunforsvaret deles ofte inn i det medfødte- og det ervervede infeksjonsforsvar. Det medfødte infeksjonsforsvaret er nedarvede egenskaper som individet har fra fødselen av. Det er uspesifikt og består av den fysiske barriere (hud, slimhinner), molekyler i slimhinner og serum, og fagocyterende celler. Det ervervede infeksjonsforsvar er spesifikt og utvikles som en følge av kontakt med mikroorganismer. Når vi har en infeksjon i kroppen eller får en vaksine aktiveres det ervervede infeksjonsforsvaret slik at vi ved en senere anledning er beskyttet mot en ny

infeksjon av samme mikroorganisme. Spesifisitet, hukommelse og toleranse er kjennemerker for dette systemet, og lymfocytter er essensielle. B- og T-celler har reseptorer som kan gjenkjenne antigener. Hver lymfocytt har kun identiske reseptorer i cellemembranen. Forskjellige lymfocytter har forskjellige reseptorer, noe som gjør at de reagerer på ulike antigener. En lymfocytt som binder et antigen vil være spesifikt for dette antigenet, og kan ikke aktiveres av andre antigener. Når immunsystemet er aktivert mot et spesifikt antigen utvikles det hukommelsesceller, disse beskytter individet mot gjentatte infeksjoner av samme mikroorganisme (antigener). B- og T-cellene har ulike funksjoner. Grovt sett kan man si at B-cellene etter aktivering produserer immunglobuliner (Ig), som kan binde seg til for eksempel virus eller bakterier, og videre aktivere det medfødte infeksjonsforsvaret (Figur 1). Dette fører til uskadeliggjøring av antistoffdekkede mikroorganismer. T-celler produserer ikke Ig, men utøver sin effekt ved å binde seg til cellemembraner. Effekten av dette er avhengig av hvilken type T-celle som er aktivert.  $CD8^+$  T-celler induserer apoptose (programmert celledød) i de cellene de er bundet til, mens  $CD4^+$  T-celler aktiverer cellen den er bundet til (B-celler, makrofager). Alle lymfocytene produserer en rekke cytokiner. Cytokiner er ulike signalmolekyler som er skilt ut av immunceller, og utøver sin virkning på andre celler. Eksempler på ulike cytokiner er TNF, interferoner, interleukiner, APRIL (A-proliferation-inducing ligand), TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), og BAFF (B celle aktiverings faktor). For at en B-celle skal bli aktivert må den både binde et antigen, og binde seg til en T-celle som er aktivert av samme antigen. For å aktivere en T-celle må reseptoren binde seg til et antigen samtidig som den får et ko-stimulerende signal. Celler fra det medfødte infeksjonsforsvaret fagocytterer, prosesserer og presenterer antigener for B- og T-celler i lymfekjertler. Slik er det ervervede infeksjonsforsvaret avhengig av det medfødte.



**Figur 1:** Figuren viser aktivering av B-celler via antigen og CD4<sup>+</sup> T-celler, og samarbeidet mellom antistoffer og det medfødte infeksjonsforsvaret.

Immunsystemet angriper normalt ikke kroppens egne celler, men kun kroppsfremmede celler og molekyler. Man sier at immunsystemet har selv-toleranse. Celler som reagerer mot kroppens egne celler skal bli destruert. Noen ganger blir ikke disse autoreaktive cellene destruert slik de skal. Det oppstår da et toleransebrudd. Immunforsvaret begynner da å oppfatte kroppens egne celler og molekyler som kroppsfremmede, og reagerer på- og danner antistoffer mot disse cellene. Disse antistoffene kalles auto-antistoffer. Konsekvensen av denne autoantistoffproduksjonen kan være utviklingen av en autoimmun sykdom. Autoantistoffene kan være organspesifikke eller ikke-organspesifikke. De organspesifikke autoantistoffene er rettet mot autoantigener som bare uttrykkes i bestemte organ, for eksempel autoantistoffer mot  $\beta$ -celler i pankreas som vil kunne forårsake Diabetes mellitus type I. Ikke-organspesifikke autoantistoffer er rettet mot autoantigener som spredt i kroppen, et eksempel på dette er antinukleære antistoffer som man finner i SLE.



## Patogenese:[5]

Patogenesen til SLE er ikke fullstendig kjent. Den grunnleggende defekten i SLE er mangelen til å opprettholde selv-toleranse. Autoreaktive B- og T-celler står sentralt i SLE patogenesen. Normalt, når en celle dør via apoptose blir cellerestene fagocyttert, og blir ikke presentert for lymfocytter. Ved SLE tror man at fagocytosen er ineffektiv slik at noe av cellerestene (antigener), spesielt kjerneinnholdet, blir tatt opp av antigenpresenterende celler. Disse selv-antigene kan så bli presentert for autoreaktive T-celler, som igjen kan stimulere autoreaktive B-celler til å produsere antistoffer mot disse selv-antigenene. Autoantistoffer kan enten skade vev direkte eller gjennom immunkompleksavleiringer. Resultatet av dette er inflammasjon, vaskulitt og/eller trombose. Kombinasjonen av produksjon av autoantistoffer og mangelfull inaktivering av autoreaktive B- og T-celler fører til aktivering av komplementsystemet og abnormal cytokinproduksjon. Dette kan bidra til økt inflammasjon i de spesifikke organene. Autoantistoffer kan være tilstede i mange år før sykdommen debuterer klinisk, og antall antistoffer kan øke like før symptomene oppstår. Det er identifisert en rekke ulike antistoffer. De vanligste autoantistoffene ved SLE er:

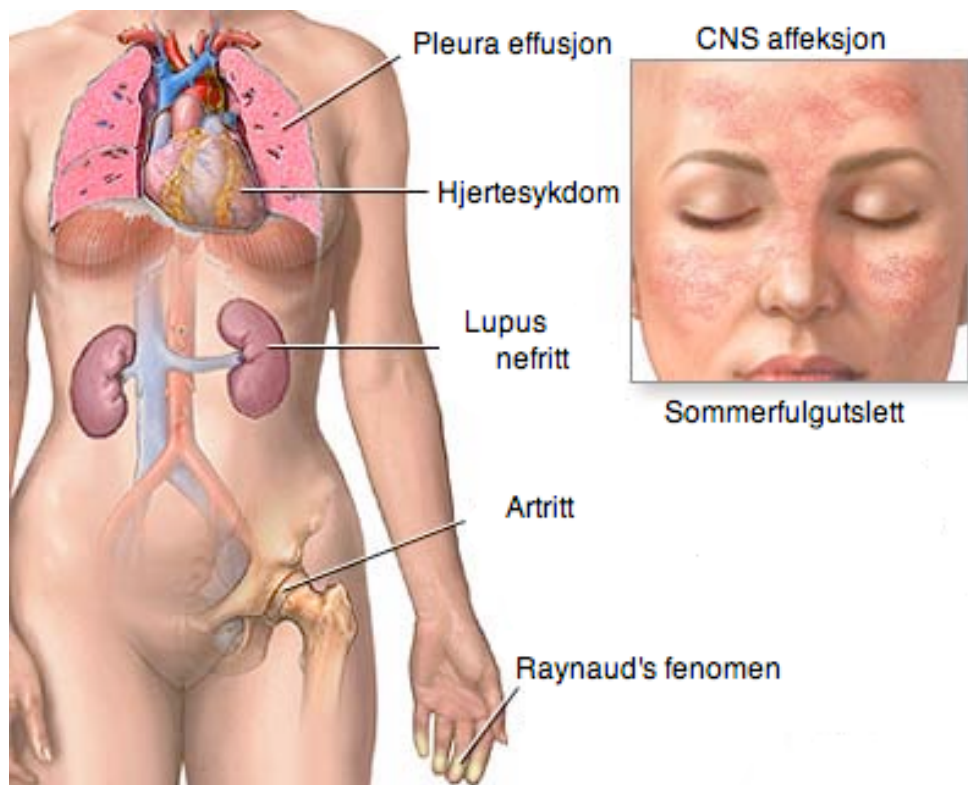
- Antinucleære antistoffer (ANA). Positivt hos opp mot 95% av pasientene.
- Anti-ds-DNA. Oftest IgG subklasse. Meget spesifikk for lupus nefritt, men forekommer kun hos omkring 20% av SLE pasienter.
- Anti-Smith (anti-Sm), oftest IgG subklasse. Ses hos 5- 25% av SLE pasienter.
- Anti-RNP ses hos 25-47% av SLE pasientene.
- Anti-Ro (Anti-SSA), Anti-La (Anti-SSB). Anti-Ro og anti-La kan krysse placenta og gi hjertefeil hos foster.
  - o Anti-SSA og anti-SSB står for Sjögrens syndrom A og - B.
- Antistoffer mot fosfolipider (aPL), (anti-cardiolipid og/eller lupus coagulans og/eller B2 mikroglobulin). Påvises hos omkring 30%. Disse gir økt risiko for venøs og arteriell trombose, spontanabort og trombocytopeni.

- Antistoffer mot blodplater, erythrocytter, Glycoprotein II-III og cytoplasma antigener.

### Klinikk og organmanifestasjoner ved SLE: [2]

SLE er en sammensatt sykdom. Det kliniske bildet ved SLE varierer fra pasient til pasient, og er avhengig av hvilket organ som er affisert (Figur 2). Derfor kalles SLE en av de store "imitatorene".

Det varierte og sammensatte sykdomsbildet vanskeliggjør diagnostikk. Det tar derfor som regel år fra symptomdebut til diagnose. Sykdommen inneholder elementer fra hele fagområdet indremedisin. Man deler ofte pasientene inn i tre grupper utfra hvilke organ som er affisert: Pasienter med nyre affeksjon, leddaffeksjon eller hudaffeksjon.



**Figur 2:** Noen av de vanligste organmanifestasjonene ved SLE.

Slimhinner:

Ulcerasjoner i munn og nese forekommer hyppig. Sekundært Sjøgrens syndrom ses hos 1/5 av pasientene med SLE.

Bevegelsesapparatet:

Artralgi forekommer hos nesten alle. Artritt i småledd kan forekomme, men gir svært sjeldent degenerative forandringer. Tenosynovitt er vanligere enn artritt. Jaccoud-deformiteter i hender/føtter utvikles hos rundt 10%, og kan minne om feilstillingene man ser ved revmatoid artritt. Feilstillingene ved SLE er midlertid forårsaket av dislokasjon eller seneruptur, de lar seg derfor reponere. Myalgi er vanlig, subklinisk myositt med lett CK-stigning forekommer.

Hjertet og blodkar:

Symptomgivende perikarditt med perikardvæske utvikles hos 1/3 av pasientene. Myokarditt og kardiomyopati forekommer. Endokarditt med klaffeaffeksjon ses hos 15 %, og er en fryktet manifestasjon ved SLE (Libman-Sacks syndrom). Det er en økt risiko for kardiovaskulær sykdom ved SLE og alle pasienter bør kartlegges for risikofaktorer og gjennomføre ultralyd-doppler av halskar for vurdering av plakkdannelse.

Kutan vaskulitt gir en rekke ulike hudmanifestasjoner. Ulcerering er sjeldent og er ofte begrenset til mikroinfarkter i neglesenger og fingerpulpae. Livedo reticularis er en form for purpura som ses som et retikulært og blålig utslett, oftest lokalisert til ekstensorsiden av albuer og på fingre. Raynauds fenomen ses hos < 25%, og oftest hos pasienter med anti-RNP-antistoffer. Trombosedannelse er et betydelig problem ved SLE og kan ramme ethvert organ.

Pulmonale affeksjoner:

Pleuraaffeksjon er langt vanligere enn affeksjon av lungeparenkymet ved SLE. Omkring ½ av pasientene har plevritt med væskedannelse.

Hovedsymptomer på dette er dyspné og hoste. Akutt pneumonitt, kronisk diffus interstitiell lungesykdom og pulmonal hemoragi ses en sjelden gang.

Retikuloendotelial system og magetarmkanal:

Hos omkring 50% av pasientene vil man se lymfadenopati. Biopsi av lymfeknuter viser som regel uspesifikke og reaktive forandringer. Det ses en overhyppighet av tymomer blant SLE pasienter. Hepatosplenomegali er ikke sjelden. Peritonitt er uvanlig, men forekommer.

Hudaffeksjon:

I sykdommens startfase ses hudmanifestasjoner hos ca. 20-25%, men i løpet av sykdomsforløpet utvikles dette hos mer en 70% av pasientene. Det klassiske sommerfugleksantemet er relativt typisk for SLE, men forekommer ikke hos mer enn 20-30% av pasientene. Her affiseres neserygg og kinn. Etiologien bak dette er vaskulitt. Alopeci utvikles hos 30-40%. En rekke andre kutane manifestasjoner som urticaria, purpura, bullae ses også. Over halvparten av pasientene rapporterer solømfintlighet. Det er også vist at røyking er en annen viktig årsaksfaktor ved kutan LE. Diskoid lupus er et utslett som sees hos 6-7 % av SLE pasientene.

Nyrer:

Ved sykdomsdebut har kun 16% av pasientene nefritt, men 30-50% vil utvikle dette i løpet av de første 5 sykdomsårene. Det vanligste er immunkompleks-mediert glomerulonefritt, men også renal tubulær acidose

ses ved SLE. Noen utvikler nefrotisk syndrom. Nyrebiopsi er viktig for å kunne si noe mer definitivt om diagnosen og prognosen til pasienten. Det finnes i alt seks ulike typer lupusnefritt, klassifisert av International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) 2003 [6]. Denne inndelingen har man for at det skal være enklere å si noe om prognosen til hver enkelt pasient. Symptomer ved lupus nefritt er proteinuri, hematuri, pyuri og sylindre i urinen. Skaden på nyren kan manifestere seg i tilførende kar, i interstitiet/tubuli og i glomeruli. Ved ubehandlet lupusnefritt vil man få hypertensjon, og kunne utvikle nyresvikt. Dette kan medføre behov for dialyse og evt. nyretransplantasjon.

CNS:

14% -75% av pasienter med SLE utvikler affeksjon av sentralnervesystemet [7]. Årsaken er oftest mikrotrombose, mens cerebrale vaskulitter er langt sjeldnere. Manifestasjonene presenteres ofte som en kombinasjon av fokalnevrologiske utfall, som pareser og epilepsi, og psykiatriske symptomer, som depresjon og psykoser. Reduksjon i kognitive funksjoner og migrenelignende hodepine er svært vanlig. Kliniske manifestasjoner fra CNS kan både være primære og sekundære. Fatigue, eller utmattelse, er et betydelig problem ved SLE. Grad av fatigue er ikke korrelert til sykdomsaktivitet, men har sammenheng med smerte, depresjon og psykososiale forhold. Dette medfører ofte store begrensinger i hverdagen til pasientene. Majoriteten av pasientene over 45 år i Tromsø Lupus cohort er uføretrygdet. Fatigue er en viktig årsak til dette.

Øyemanifestasjoner:

Konjunktivitt, skleritt og episkleritt forekommer. Retinaforandringer med eksudater og blødninger er vanlig. Hos pasienter med tromboserisiko sees akutt sentralvene/arterie trombose.

## Diagnose:

Mange av symptomene på SLE er uspesifikke. Å stille en sikker diagnose tidlig i sykdomsfasen kan være vanskelig. Det finnes ingen diagnostiske kriterier for SLE, men det er utarbeidet klassifikasjonskriterier. Det kan ta år før pasienter tilfredsstiller kriteriene for SLE. Klassifikasjonskriterier for SLE er utarbeidet av American College of Rheumatology (ACR) [8, 9].

Pasienter med 4 eller flere av følgende kriterier defineres å ha SLE:

- Sommerfugleksantem
- Diskoid lupus erythematosus
- Lysoverfølsomhet
- Slimhinesår i munn, nese eller svelg
- Polyartritt, ikke-erosiv, artralgi/artritt
- Serositt - pleuritt, perikarditt, endokarditt
- Nefropati - proteinuri > 0,5 g/døgn og/eller kornete sylindre
- CNS-affeksjon - epilepsi og/eller psykose
- Affeksjon av perifert blod - hemolyse og/eller trombocytopeni og/eller leukopeni eller lymfopeni
- Serologi – Anti-DNA antistoff og/eller anti-Sm antistoff og/eller non-luetisk WR og/eller aPL.
- ANA-positiv

Kriteriene er vist å ha en sensitivitet på 78-96% og en spesifisitet på 89-100% [10].

## Behandling av SLE [2, 11]

Den medikamentelle behandlingen av SLE har utviklet seg lite de siste 50 årene, frem til for noen få år siden. Kortikosteroider og immunosuppressive medikamenter har vært mye brukt, men de har en alvorlig bivirkningsprofil. Nyere kunnskap om patogenesen, gir håp om å kunne utviklet nye selektive medikamenter med en mildere bivirkningsprofil. Ett godt eksempel på dette er belimumab, som er ett monoklonalt antistoff, som gjenkjenner og hemmer biologisk aktiv BAFF spesifikt [12]. I 2011 ble dette medikamentet godkjent for behandling av moderat til alvorlig SLE. Det er også blitt gjort forsøk med medikamenter som hemmer reseptoren Transmembran activator (TACI), som både BAFF og APRIL binder til [13]. Disse medikamentene er ennå ikke godkjent til bruk ved behandling av SLE.

### Kortikosteroider

Glukokortikoider har bred immunodepressiv effekt, med evne til å nedregulere både det medfødte og det ervervede infeksjonsforsvaret. Dette fører til at prostaglandin- og cytokin produksjonen reduseres, noe som demper inflammasjon. Dette er den viktigste og mest effektive korttidsbehandlingen av SLE. Langtidsbivirkninger i form av osteoporose, katarakt og diabetes mellitus begrenser bruken av disse medikamentene.

### Antimalariamedikamenter

Chloroquine og hydrochloroquine er de vanligste antimalariamidlene som brukes til behandling av SLE. Disse har blitt brukt i mange år, til tross for begrenset forståelse av virkemåte. Medikamentene har størst effekt for behandling av fatigue, utslett og for å hindre residiv og eksaserbasjon av sykdommen. Disse medisinene har få farlige bivirkninger og de er billige.

Azatioprin:

En purine analog som hemmer DNA syntese og lymfocytt proliferasjon. Brukes også til behandling av inflammatorisk tarmsykdom. Azatioprin kan bli brukt som ett alternativ til myclofenolat og cyclofosfamid.

Metotrexat:

Metotrexat er en folsyreanalog som hemmer purine syntesen. Det blir vanligvis brukt til behandling av artritt og hudmanifestasjoner av SLE. Det kan også brukes mot Sjøgrens syndrom eller mot Sjøgrens symptomer hos SLE pasienter. Effekten til metotrexat er ikke veldig stor, og man bruker det ikke ved store organ manifestasjoner.

Mycofenolat:

Mycofenolat er en hemmer av DNA syntesen som hindrer T og B lymfocytt proliferasjon. Myclofenolat ble først brukt som ett medikament ved nyretransplantasjon. Det brukes som ett alternativ til cyklofosfamid ved vedlikeholdsbehandling. Dette medikamentet tolereres vanligvis godt. Men man har en risiko for å få opportunistiske infeksjoner. Det har vist seg å ha ekstra god effekt hos afroamerikanere og hispaniere.

Cyclofosfamid (Sendoxan)

Cyklofosfamid virker alkylende, og fører til celledød. Det er derfor sterkt immunosuppressivt. Bruken av dette medikamentet er forbeholdt de med alvorlige manifestasjoner av autoimmun sykdom og noen maligniteter. Dette har inntil nylig vært standard behandling mot proliferativ lupus nefritt i kombinasjon med glukokortikoider. Cyclofosfamid har alvorlige



bivirkninger pga. den sterke immunsuppresjonen, og ved lang tids bruk kan den føre til prematur ovarialsvikt, og økt risiko for blærekreft.

## Rituximab

Kimerisk monoklonalt antistoff mot CD20, som er en overflatemarkør på modne B-celler. Behandling med rituximab induserer hemming av sirkulerende B-celler. Rituximab ble først brukt mot non-Hodgkin's lymfom. CD-20 blir ikke uttrykt på plasmaceller. Det har blitt gjort flere studier på effekten mot SLE med varierende resultater. Dette er ett medikament man kan prøve i enkelttilfeller.

## **Prognose:**

Prognosen ved SLE er avhengig av sykdommens alvorlighetsgrad og hvilke organer som er affisert og i hvilken grad kardiovaskulære komplikasjoner utvikles. For hele pasientgruppen foreligger det en reduksjon i 5, 10, 20 års overlevelse (50-97%, 54-93% og 68%) [2]. Dårligst prognose ses hos de med alvorlig nefritt, hypertensjon, trombocytopeni, pulmonal affeksjon, CNS-affeksjon og pasienter med sykdomsdebut over 50 år. Slike manifestasjoner sammen med kompliserte infeksjoner utgjør en betydelig andel av sykdomsrelaterte dødsfall ved SLE. Sent i sykdomsforløpet er terapikomplikasjoner en årsak til for tidlig død. Prognosen er også avhengig av hvilken forhåndsregler man tar i forhold til den økte risikoen for aterosklerotisk hjertesykdom.

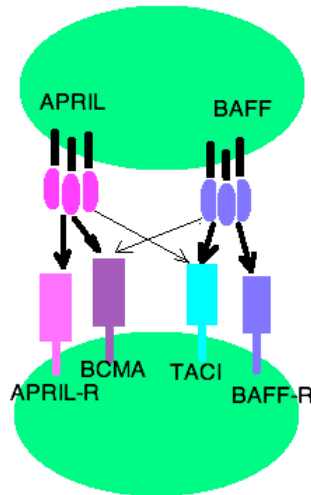
## **Cytokinet BAFF**

BAFF er også kjent som B-lymfocyt stimulator (BlyS), og er ett cytokin som er medlem i TNF ligand familien [14]. Dette cytokinet er viktig for B-celle immunitet. BAFF hemmer apoptose av B-celler [15]. Det er et type II transmembranprotein som finnes på myeloide celler, som makrofager, monocytter og dendrittiske celler. BAFF finnes også på stromale celler i beinmargen. Interferon  $\gamma$  stimulerer ekspresjonen av BAFF i disse cellene. BAFF danner homotrimerer når det skal binde til reseptorene sine, i tillegg eksisterer BAFF i en løselig form som er biologisk aktiv [16]. BAFF binder til tre reseptorer, BAFF reseptor (BAFF-R), Transmembran activator (TACI) og B-cell maturation protein (BCMA) (Figur 3). Den binder til disse reseptorene med ulik affinitet. Reseptorene finnes hovedsakelig på modne B-lymfocytter. Den binder med lavest affinitet til TACI. TACI har høyest affinitet for APRIL. BCMA bindes med lik affinitet til BAFF og APRIL. Signal via BAFF-R og BCMA stimulerer B-celler til proliferasjon og hemming av apoptose. Dysregulering av BAFF ekspresjon kan føre til progresjon og opprettholdelse av humoral autoimmunitet. Dysregulert BAFF ble først linket til lupus patogenesen ved hjelp av BAFF transgenemus. Disse musene hadde hypergammaglobulinemi, økte nivå av anti-dsDNA antistoffer og økt immunoglobulin nedslag i nyrene [15]. Det var også økt mengde sirkulerende B-celler, hepatosplenomegali, økte reaksjoner i germinalsenter og ekspansjon av marginal sone B-celler i lymfeknuter. Overskudd av BAFF kan føre til at autoreaktive B-celler ikke dør ved apoptose.

## **Cytokinet APRIL**

APRIL, også kalt tumor nekrosis faktor ligand member 13 (TNFSF13) er ett humant protein som kodes av TNFSF13 genen. Det har blitt vist at dette proteinet og reseptoren til proteinet er viktig for B-celle modning og utvikling. APRIL interagerer med TNFRSF13B og BAFF. APRIL kan

binde reseptorene TACI, APRIL reseptor (APRIL-R) og BCMA (figur 3). Binding til TACI induserer til Ig isotypeskift. APRIL ser ut til å ha en rolle i T-celle uavhengig type-II antigen responser og T-celle overlevelse.



**Figur 3:** Interaksjon mellom BAFF, APRIL og deres reseptorer APRIL-R, BCMA, TACI og BAFF-R. Figuren viser mulig interaksjon mellom TNF-superfamilie medlemmene, BAFF og APRIL, og deres reseptorer. Pilene indikerer relativ styrke på ligandbinding. Jo kraftigere pilen er desto kraftigere affinitet mellom reseptor og ligand[14].

Rollen til APRIL i lupus patogenesen er ikke helt kjent. APRIL-transgene mus viste økt t-celle overlevelse og T-uavhengig antistoff respons. Økte APRIL nivå i SLE pasienter har vært rapportert, mens invers korrelasjon mellom APRIL nivå og sykdomsaktivitet var rapportert i en annen studie [17]. Denne diskrepansen kan skyldes overekspresjon av heterotrimerer (trimer bestående av tre ulike monomerer/enheter) mellom APRIL og BAFF, som er rapportert i mange systemiske autoimmune sykdommer, dvs interferering ved deteksjon av individuelle protein i pasient serum [15].

## **Cytokinet TRAIL**

TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) er ett protein som fungerer som en ligand som induserer apoptose. Genet for TRAIL finnes på kromosom 3q26. Det består av 281 aminosyrer, og et type II transmembranprotein. TRAIL uttrykkes på flere ulike celler, inkludert lymfocytter, NK-celler, dendrittiske celler, makrofager og virusinfiserte antigenpresenterende celler [18]. TRAIL binder til dødsreseptorene DR4 (TRAIL-RI) og DR5 [19]. Apoptosen er kaspase-8 avhengig. TRAIL binder også til DcR1 og DcR2. DcR1 fungerer som en TRAIL-nøytraliserende decoy-reseptor. Dette aktiverer NfκB. I celler som uttrykker DcR2, vil binding til TRAIL aktivere NfκB, som fører til transkripsjon av gener som er kjent for å hemme døds-signalveien og/eller promotere inflammasjon.

## **Metode:**

Oppgaven er en kauskontroll studie. Pasientene i oppgaven er hentet fra Tromsø Lupus cohort. Deltagerinformasjon og prøvemateriale (serum) ble innhentet fra Ben og ledd forskningsgruppe, Reumatologisk laboratorium, Helsefak UIT, og Avdeling for laboratoriemedisin ved UNN. Alle deltakerne har gitt skriftlig samtykke for deltagelse i BAFF studien. Studien ble godkjent av regional etisk komite (REK Nord) ved universitetet i Tromsø, personvernombudet og Helse- og Omsorgsdepartementet. Diagnosetidspunkt er definert som det tidspunktet pasienten oppfylte fire American College of Rheumatology (ACR) kriterier, enten ved bruk av ACR82 eller ACR97 [8, 9]. Alle pasientene i studien er under oppfølging ved reumatologisk poliklinikk/avdeling. Alle kontrollene i studien var friske. Serumsnivåene av cytokinene BAFF, APRIL og TRAIL ble målt ved hjelp av ELISA teknikk. BAFF nivået var tidligere målt med Quantikine Human BAFF/BLyS/TNFSF13B Immunoassay

(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), men resultatene er inkludert i denne studien for å sammenligne cytokinnivåene. Dette var naturlig å gjøre da funksjonen til APRIL og BAFF er nært knyttet til hverandre.

ELISA-(Enzyme-linked immunosorbent assays)

Metode og protokoll, se appendix 1.

Vi brukte to kommersielle DuoSet ELISA kit fra R&D Systems.

- APRIL/TNFSF13 (A Proliferation-inducing Ligand)
- TRAIL/TNFSF10

### **Statistiske metoder**

Dataprogrammet SPSS statistics v19 har blitt brukt til de statistiske beregningene i oppgaven. Utvalgene var ikke normalfordelte, og all data presenter som median  $\pm$ SD (standard deviasjon). Statistisk signifikans er satt til  $p < 0,05$ . Det har blitt brukt en ikke-parametrisk metode for sammenligning av to uavhengige utvalg, Kolmogorov-Smirnov Z test, ved sammenligning av kontinuerlige data. Ved korrelasjonsanalyser har det blitt brukt Spearmans rang korrelasjonskoeffisient på grunn av skjevfordeling i utvalgene. For å sammenligne kategoriske data i utvalgene har det blitt brukt chi-kvadrat test. For å vise om utvalgene var like mht. kjønn og alder ble det brukt en Mann Withney U test.

## Resultater:

### Informasjon om utvalgene:

I studien var det totalt 100 SLE pasienter, og 31 friske kontroller. Tabell 1 viser demografisk oversikt over gruppene.

Median alder ved prøvedato var for SLE pasientene 47 år (SD±16,1), og 48 år (SD±14,8) for kontrollene. Det var ingen signifikant forskjell i alder mellom gruppene ( $p = 0,5$ ).

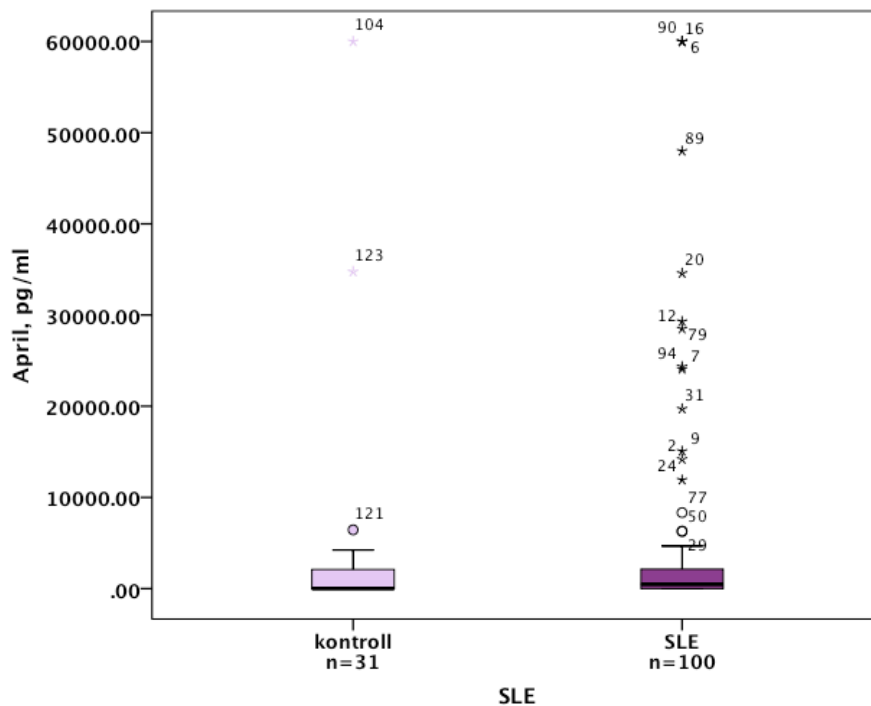
Det viste seg å være en signifikant forskjell i kjønnsfordeling i de to utvalgene, med  $p = 0,04$ .

**Tabell 1:** Demografisk oversikt over gruppene. SD; standard deviasjon

	SLE	Kontroller
Deltagere: n	100	31
Kvinner	87	22
Menn	13	9
Median alder ved diagnose	32,5 år (SD± 14,3)	
Median varighet av sykdom	10 år (SD± 10)	
Median alder ved prøvedato	47 år (SD± 16,1)	48 år (SD± 14,8)

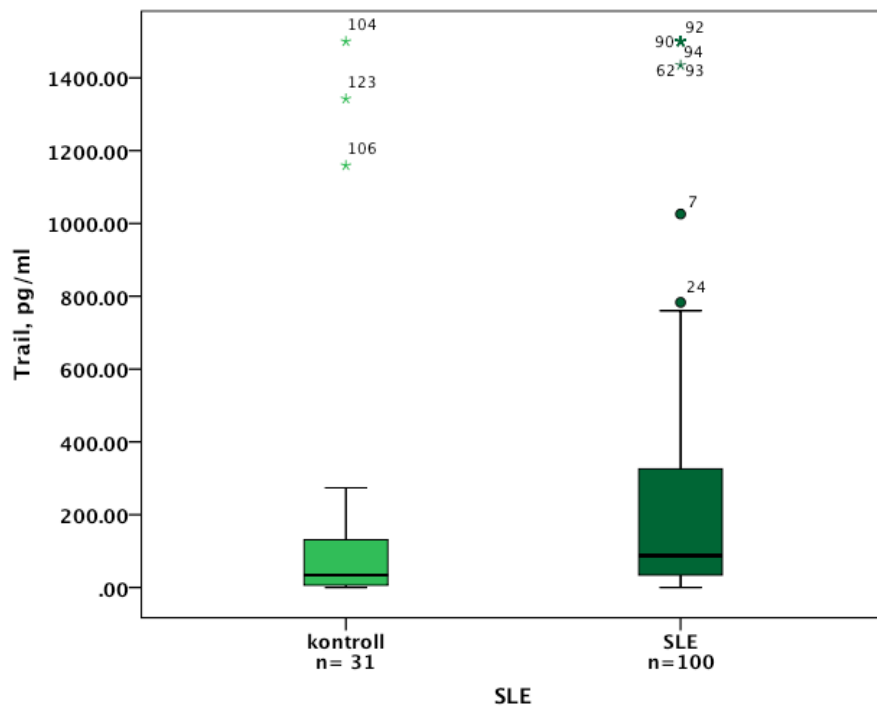
## Analyse av cytokinene APRIL, TRAIL og BAFF.

Konsentrasjonen av APRIL i serum var høyere hos SLE pasienter sammenlignet med friske kontroller, 477,9 pg/ml (SD±12626,1) vs. 0,00 pg/ml (SD±12143,5). Dette viste en signifikant forskjell mellom de to gruppene (p = 0,015) (Figur 4).



**Figur. 4:** Serum-April i SLE pasienter er høyere sammenlignet med friske kontroller p=0,015. Resultatene vises i et box plot. Den svarte linjen indikerer medianen, og de ytre grensene til boksene angir 25 og 75 persentilene. Linjene som utgår fra boksene angir 10 og 90 persentilen.

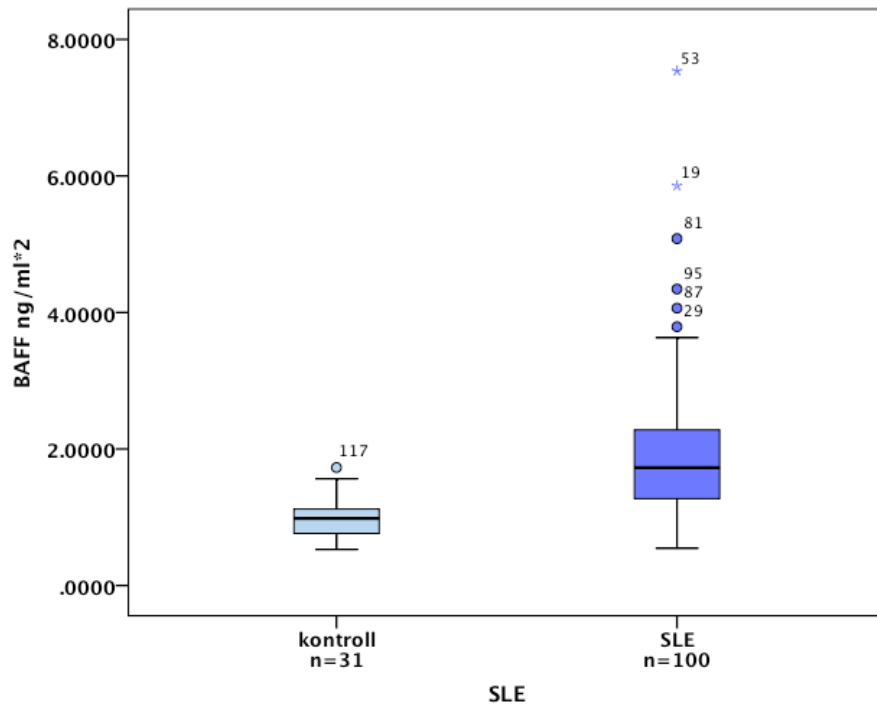
S-TRAIL er også høyere hos SLE pasienter, og ble målt til 34,18 pg/ml (SD± 392,2) i kontrollgruppen, og til 87,83 pg/ml (SD± 491,4) blant SLE pasientene. Dette viste en signifikant forskjell mellom de to gruppene (p = 0,044) (Figur 5).



**Figur. 5:** Serum-TRAIL konsentrasjonen i SLE pasienter er økt sammenlignet med friske kontroller p=0,044. Resultatene vises i et box plot. Den svarte linjen indikerer medianen, og de ytre grensene til boksene angir 25 og 75 persentilene. Linjene som utgår fra boksene angir 10 og 90 persentilen.



S-BAFF ble målt til 0,98 ng/ml (SD± 0,27) i kontrollgruppen, og til 1,73 ng/ml (SD± 1,10) blant SLE pasientene. Dette viste en signifikant forskjell mellom de to gruppene ( $p < 0,001$ ) (Figur 6).



**Figur 6:** Serum-BAFF i SLE pasienter er økt sammenlignet med friske kontroller  $p < 0,001$ . Resultatene vises i et box plot. Den svarte linjen indikerer medianen, og de ytre grensene til boksene angir 25 og 75 persentilene. Linjene som utgår fra boksene angir 10 og 90 persentilen.

## **S-konsentrasjon av cytokiner hos kvinner og menn med SLE**

Blant pasientene var det 13 menn og 87 kvinner

S-APRIL ble målt til 934,3 pg/ml (SD± 5610,1) hos menn, og til 422,2 pg/ml (SD± 13359,9) hos kvinner. Det var ingen signifikant forskjell mellom kjønnene ( $p = 0,4$ ).

S-TRAIL ble målt til 255,2pg/ml (SD± 410,7) hos menn, og til 82,2 pg/ml (SD± 504,4) hos kvinner. Det var ingen signifikant forskjell mellom kjønnene ( $p = 0,2$ ).

S-BAFF ble målt til 1,43 ng/ml<sup>2</sup> (SD± 0,95) hos menn, og til 1,75 ng/ml<sup>2</sup> (SD± 1,13) hos kvinner. Det var ingen signifikant forskjell mellom kjønnene ( $p = 0,4$ ).

## **S-konsentrasjon av cytokiner hos pasienter med og uten lupus nefritt (LN).**

I gruppen med SLE var det 30 med lupusnefritt og 70 uten.

S-APRIL ble målt til 505,8 pg/ml (SD± 9487,7) hos pasienter uten LN, og til 436,1 pg/ml (SD± 17830) hos pasienter med LN. Det var ingen signifikant forskjell mellom pasientene med og uten LN ( $p = 0,8$ ).

S-TRAIL ble målt til 99,7 pg/ml (SD± 469,1) hos pasienter uten LN, og til 63,4 pg/ml (SD± 547,9) hos pasienter med LN. Det var ingen signifikant forskjell mellom pasientene med og uten LN ( $p = 0,6$ ).

S-BAFF ble målt til 1,66 ng/ml<sup>2</sup> (SD± 1,1) hos pasienter uten LN, og til 1,83 ng/ml<sup>2</sup> (SD± 1,1) hos pasienter med LN. Det var ingen signifikant forskjell mellom pasientene med og uten LN (p = 0,8).

### **Korrelasjon mellom serum konsentrasjoner av cytokiner og sirkulerende faktorer hos pasienter med SLE**

Det ble funnet en invers korrelasjon med s-APRIL og s-TRAIL spearman rank koeffisient -0,55, (p <0,01). S-TRAIL og s-BAFF hadde også en invers korrelasjon, med en spearman rank koeffisient -0,20, (p < 0,05). Se tabell 2.

### **Assosiasjon mellom s-konsentrasjon av cytokiner og autoantistoffer.**

SLE pasienter med påvisbare anti-SSB antistoff hadde høyere konsentrasjon av S-APRIL sammenlignet med SLE pasienter uten anti-SSB antistoff. (4365,84 pg/ml (SD± 20217,68) vs. 375,82 pg/ml (SD± 12025,49). Forskjellen var signifikant, (p = 0,012).

SLE pasienter med positive aPL hadde lavere konsentrasjon av S-TRAIL enn SLE pasienter uten aPL. (33,31 pg/ml (SD± 335,15) vs. 82,01 pg/ml (SD± 486,53). Dette viste en signifikant forskjell mellom de med og uten positiv aPL (p = 0,020).

Det var ingen signifikant forskjell mellom s-APRIL, s-TRAIL, s-BAFF og andre autoantistoffer.

## Diskusjon

I denne tverrsnittsanalysen har vi sammenlignet serumkonsentrasjon av cytokiner mellom SLE pasienter og friske kontrollere. Vi har sett på cytokinene APRIL, TRAIL og BAFF. Alle de tre undersøkte cytokinene hadde en signifikant høyere konsentrasjon hos SLE pasientene enn hos de friske kontrollene.

Det er tidligere vist at pasienter med SLE har høyere serumkonsentrasjon av BAFF enn friske kontrollere [20]. Det er også vist i tidligere studier at APRIL konsentrasjonen blant SLE pasientene er høyere i forhold til kontrollere [21]. Våre funn er i samsvar med disse resultatene, men forskjellig fra en studie fra Frankrike der Morel et al undersøkte 43 pasienter med SLE og fant en invers korrelasjon mellom s-APRIL og s-BAFF [22]. Vi vet ikke årsaken til disse ulike funn, men en årsak kan være ulike kohorter siden SLE pasienter er en heterogen gruppe. Vi påviste økt TRAIL konsentrasjon blant SLE pasientene i forhold til kontrollene, og det stemmer godt med tidligere studier [19]. Det ble funnet en invers korrelasjon mellom TRAIL og BAFF, og en invers korrelasjon mellom TRAIL og APRIL. Disse sammenhengene er ikke vist før hos SLE pasienter. Ut fra disse funn lurer vi på om TRAIL kan ha en beskyttende effekt. Lamhamedi-Cherradi et al har vist at TRAIL er viktig for å hindre utvikling av autoimmun sykdom i forsøksdyr [23], men på den andre siden vet vi at TRAIL induserer apoptose [18]. Økt apoptose kan føre til akkumulasjon av apoptotiske celler. Økt mengde apoptotiske celler og apoptotisk materiale kan indusere autoimmunitet [19]. Vi fant også en assosiasjonen mellom lav s-TRAIL og positiv aPL status, men denne sammenhengen kan vi ikke forklare, og det er i tillegg svært få studier på TRAIL hos SLE pasienter. Disse funnene viser at TRAIL sin rolle i lupuspatogenesen fortsatt ikke er helt avklart.

Cytokiner er flyktige signalmolekyler. Konsentrasjonen av cytokiner i blod kan variere hos hver enkelt pasient, det samme kan konsentrasjonen i ulike organer gjøre. Cytokinene kan også ha ulik funksjon i forskjellige organ. I vår studie hadde ikke SLE pasienter med lupusnefritt økte cytokinnivå i

forhold til andre SLE pasienter. Vi har analysert for cytokiner i serum, og ikke i nyreparenchym. Vi mangler derfor kunnskap om hvordan cytokinenivåene er lokalt i nyrene. Kanskje burde man målt cytokinnivå i parenchym fra affiserte organ. Dette har George-Chandy et al gjort med cerebrospinalvæske (CSF), der de har vist at SLE pasienter har økte BAFF- og APRIL nivåer i CSF, og at pasienter med CNS affeksjon har økte APRIL nivåer i CSF i forhold til andre SLE pasienter [7].

Det er flere mulige feilkilder i vår studie. På grunn av at vi har relativt få deltagere er det en mulighet for å få en type II feil. Spredningen av data kan bli stor, og selv om det er en forskjell kommer det ikke frem pga. få deltagere. Tidligere er det beskrevet at både APRIL og BAFF danner homotrimere molekyler. Roschke et al har vist at APRIL og BAFF kan danne aktive heterotrimerer. Overekspresjon av slike heterotrimerer kan gi intereferering ved deteksjon av individuelle protein i pasient serum, som vil gi falske positive verdier [24]. Cytokiner som er bundet til reseptorer vil ikke være detekterbare, dette kan føre til at man vil kunne måle en for lav verdi. Det er også vist at det kan dannes autoantistoffer mot BAFF, som vil inaktivere cytokinet og minke tilgjengelig BAFF ved ELISA analyse [16]. De fleste pasientene står på immunosuppressive medikamenter og kortikosteroider, som kan senke BAFF og APRIL konsentrasjonene[16].

Det er gode holdepunkter for at APRIL, TRAIL og BAFF er viktige i SLE patogenesen da disse var økt i serum hos pasienter. Det var ingen klare korrelasjoner mellom cytokinene, noe som kan tyder på at de har ulike roller. For å kunne si noe mer bestemt om rollen til disse cytokinene i patogenesen til SLE, kreves det mer forskning. I vår studie er det få pasienter, og vi undersøkte ikke andre sykdomsmarkører. Derfor kan vi ikke dra noen sikre slutninger om hvilken rolle disse cytokinene har ved autoimmunitet.

Et medikament mot BAFF er allerede godkjent, og et medikament som hemmer både APRIL og BAFF er under utprøving. Tiden vil vise om TRAIL vil bli et utgangspunkt for utvikling av nye medikamenter mot SLE.

## Referanser:

1. Nossent, H.C., *Systemic lupus erythematosus in the Arctic region of Norway*. J Rheumatol, 2001. **28**(3): p. 539-46.
2. Gran, J.T., *Innføring i klinisk revmatologi*. Vol. 1. 2009: Gyldendal Akademisk. 94 - 106.
3. Deapen, D., et al., *A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(3): p. 311-8.
4. Clark, K., *Kumar & Clark's CLINICAL MEDICINE*. 7 ed2009: SAUNDERS Elsevier.
5. Bogen, B., Munthe, L.A., *Immunologi*2007: Universitetsforlaget.
6. Weening, J.J., et al., *The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited*. Kidney Int, 2004. **65**(2): p. 521-30.
7. George-Chandy, A., E. Trysberg, and K. Eriksson, *Raised intrathecal levels of APRIL and BAFF in patients with systemic lupus erythematosus: relationship to neuropsychiatric symptoms*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(4): p. R97.
8. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1725.
9. Tan, E.M., et al., *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1982. **25**(11): p. 1271-7.
10. Gill, J.M., et al., *Diagnosis of systemic lupus erythematosus*. Am Fam Physician, 2003. **68**(11): p. 2179-86.
11. Lo, M.S. and G.C. Tsokos, *Treatment of systemic lupus erythematosus: new advances in targeted therapy*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1247**: p. 138-52.
12. Navarra, S.V., et al., *Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2011. **377**(9767): p. 721-31.

13. Looney, R.J., *B cell-targeted therapies for systemic lupus erythematosus: an update on clinical trial data*. *Drugs*, 2010. **70**(5): p. 529-40.
14. Szodoray, P. and R. Jonsson, *The BAFF/APRIL system in systemic autoimmune diseases with a special emphasis on Sjogren's syndrome*. *Scand J Immunol*, 2005. **62**(5): p. 421-8.
15. Mok, M.Y., *The immunological basis of B-cell therapy in systemic lupus erythematosus*. *Int J Rheum Dis*, 2010. **13**(1): p. 3-11.
16. Vincent, F.B., E.F. Morand, and F. Mackay, *BAFF and innate immunity: new therapeutic targets for systemic lupus erythematosus*. *Immunol Cell Biol*, 2012. **90**(3): p. 293-303.
17. Stohl, W., et al., *Belimumab reduces autoantibodies, normalizes low complement, and reduces select B-cell populations in patients with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2012.
18. Ikeda, T., et al., *Dual effects of TRAIL in suppression of autoimmunity: the inhibition of Th1 cells and the promotion of regulatory T cells*. *J Immunol*, 2010. **185**(9): p. 5259-67.
19. Lub-de Hooge, M.N., et al., *Soluble TRAIL concentrations are raised in patients with systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(6): p. 854-8.
20. Zhang, J., et al., *Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus*. *J Immunol*, 2001. **166**(1): p. 6-10.
21. Hegazy, M., et al., *Raised serum level of APRIL in patients with systemic lupus erythematosus: correlations with disease activity indices*. *Clin Immunol*, 2010. **135**(1): p. 118-24.
22. Morel, J., et al., *Serum levels of tumour necrosis factor family members a proliferation-inducing ligand (APRIL) and B lymphocyte stimulator (BLyS) are inversely correlated in systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2009. **68**(6): p. 997-1002.
23. Lamhamedi-Cherradi, S.E., et al., *Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL<sup>-/-</sup> mice*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(3): p. 255-60.

24. Roschke, V., et al., *BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases*. *J Immunol*, 2002. **169**(8): p. 4314-21.
25. Nelson, D. and M. Cox, *Lehninger Principles of biochemistry*. 4 ed 2005: Freeman.



## Appendix 1

### ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays)

ELISA er en analysemetode der man raskt kan screene for og kvantifisere mengde antigen i en prøve. ELISA består av følgende steg: [25]

- Ett antistoff som er spesifikt til ett antigen blir festet til en inert overflate. For eksempel i bunnen av en brønn i en polystyrene 96 brønnplate.
- Det blir så tilsatt en liten prøve med biologisk prøvemateriale (for eksempel blod eller urin) hvis prøven inneholder det aktuelle antigenet, vil det oppstå en antistoff-antigen binding.
- Det blir så tilsatt ett antistoff som også er spesifikt til antigenet, men på ett annet bindingssete. Dette antistoffet er kovalent bundet til ett "målbart" enzym.
- Brønnen blir vasket og renses for antigen som ikke har bundet seg fast og for løse enzym-linkede antistoff molekyler.
- Substratet til enzym-linkede antistoff blir tilsatt. Det blir dannet ett produkt (målt som fargeintensitet). Fargeintensiteten er proporsjonal til antigen konsentrasjonen i prøven.

Vi brukte to kommersielle DuoSet ELISA kit fra R&D Systems.

- APRIL/TNFSF13 (A Proliferation-inducing Ligand)
- TRAIL/TNFSF10

## **Analyse av s-APRIL**

### Materialer:

Capture Antibody – 360 µg/ml mouse anti-human APRIL, tilsatt 1ml PBS.

Fortynnet til en arbeidskonsentrasjon på 2,0 µg/ml i PBS.

Detection Antibody – 180 µg/ml av biotinylated mouse anti-human APRIL tilsatt 1 ml reagent diluent. Fortynnet til arbeidskonsentrasjon på 1,0 µg/ml i reagent diluent.

Standard – konsentrasjon på 1250 ng/ml rekombinant human APRIL ved tilsetning av 0,5 ml reagent diluent.

Streptavidin-HRP (1,0 streptavidin konjugert til horse radish peroxidase)

PBS – buffer

Wash-buffer – 0,05 % Tween 20 i PBS, pH 7,2-7,4

Reagent diluent – 1 % BSA i PBS, pH 7,2-7,4

Substratsløsning – 1:1 reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) og reagent B (tetrametylbenzidine)

Stopløsning – 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### ELISA protokoll:

- Plate forberedelse

Capture antibody ble fortynnet til en konsentrasjon på 2,0 µg/ml, ved å tilsette 61 µl capture antibody til ett rør med 11ml PBS buffer. Det ble tilsatt 100 µl av denne løsningen til hver brønn på en 96 brønns mikroplate. Platen ble forseglet og inkubert over natten.

Hver brønn ble aspirert og vasket med wash-buffer, dette ble gjort totalt tre ganger. Hver brønn ble fylt med 400 µl wash-buffer.

Platen ble blocket med 300 µl reagent diluent i hver brønn, og inkubert i rom temperatur i en time.

Platen ble så vasket som forrige gang.

- ASSAY prosedyre

Det ble tilsatt 48 µl standardløsning til 952 µl reagentdiluent, dette ga en konsentrasjon på 60,000 pg/ml. Denne ble fortynnet til en standardrekke med 7 konsentrasjoner.

100 µl prøve eller standard (fortynnet i reagent diluent) ble tilsatt hver brønn. Brønnene ble dekket med adhesive strip og inkubert i to timer ved romtemperatur.

Platen ble vasket

100 µl detection antibody ble tilsatt hver brønn. Platen ble dekket med adhesive strip og inkubert i 2 timer ved romtemperatur.

Platen ble vasket

100 µl av streptavidin HRP (arbeidskons) ble tilsatt hver plate. Platen ble dekket til og inkubert i 20 min ved romtemperatur. Viktig å unngå at platen blir utsatt for direkte sollys.

Platen ble vasket

100 µl av substrate solution ble tilsatt hver brønn og inkubert i 20 minutter. Viktig å unngå at platen blir utsatt for direkte sollys.

50 µl av Stop solution ble tilsatt hver brønn. Platen ble ristet forsiktig for å få blandet godt.

Platen ble så avlest på en mikroplate avleser – ved 450 nm. Bølgelengden ble så korrigert ved å trekke fra avlesningsverdien 540 nm.

## Analyse av s-TRAIL

Materialer:

Capture Antibody – 360 µg/ml mouse anti-human TRAIL, tilsatt 1ml PBS.

Fortynnet til en arbeidskonsentrasjon på 2,0 µg/ml i PBS.

Detection Antibody – 9 µg/ml av biotinylated goat anti-human APRIL tilsatt 1 ml reagent diluent. Fortynnet til arbeidskonsentrasjon på 50 ng/ml i reagent diluent.

Standard – konsentrasjon på 110 ng/ml rekombinant human APRIL ved tilsetning av 0,5 ml reagent diluent.

Streptavidin-HRP (1,0 ml streptavidin konjugert til horse radish peroxidase)

PBS – buffer

Wash-buffer – 0,05 % Tween 20 i PBS, pH 7,2-7,4

Reagent diluent – 1 % BSA i PBS, pH 7,2-7,4

Substratsløsning – 1:1 reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) og reagent B (tetrametylbenzidine)

Stopløsning – 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

ELISA protokoll

- Plate forberedelse

Capture antibody ble fortynnet til en konsentrasjon på 2,0 µg/ml, ved å tilsette 66,6 µl capture antibody til ett rør med 12 ml PBS buffer. Det ble tilsatt 100 µl av denne løsningen til hver brønn på en 96 brønns mikroplate.

Platen ble forseglet og inkubert over natten ved romtemperatur.

Hver brønn ble aspirert og vasket med wash-buffer, dette ble gjort totalt tre ganger. Hver brønn ble fylt med 400 µl wash-buffer.

Platen ble blocket med 300 µl reagent diluent i hver brønn, og inkubert i rom temperatur i en time.

Platen ble så vasket som forrige gang.

- ASSAY prosedyre

Det ble tilsatt 13,6 µl standardløsning til 986,4 µl reagentdiluent, dette ga en konsentrasjon på 1500 pg/ml. Denne ble fortynnet til en standardrekke med 7 konsentrasjoner.

100 µl prøve eller standard (fortynnet i reagent diluent) ble tilsatt hver brønn. Brønnene ble dekket med adhesive strip og inkubert i to timer ved romtemperatur.

Platen ble vasket

100 µl detection antibody ble tilsatt hver brønn. Platen ble dekket med adhesive strip og inkubert i 2 timer ved romtemperatur.

Platen ble vasket

100 µl av streptavidin HRP (fortynnet til arbeidskonsentrasjon) ble tilsatt hver plate. Platen ble dekket til og inkubert i 20 min ved romtemperatur.

Det var viktig å unngå at platen ble utsatt for direkte sollys.

Platen ble vasket

100 µl av substrate solution ble tilsatt hver brønn og inkubert i 20 minutter.

Det var viktig å unngå at platen ble utsatt for direkte sollys.

50 µl av Stop solution ble tilsatt hver brønn. Platen ble ristet forsiktig for å få blandet godt.

Platen ble så avlest på en mikroplate avleser – ved 450 nm. Bølgelengden ble så korrigert ved å trekke fra avlesningsverdien ved 540 nm.

## Appendix 2

**Tabell 2** Korrelasjon mellom serum konsentrasjoner av cytokiner og sirkulerende faktorer hos pasienter med SLE (n=100)

	s-April	s-Trail	s-Baff	CD4	CD8	B cells	NK-celler	IgM	IgA	IgG
s-April										
s-Trail	<b>-,55**</b>									
s-Baff	-	<b>-,20*</b>								
CD4 cells	-	-	-							
CD8 cells	-	-	-	<b>,49**</b>						
B cells	-	-	-	<b>,43**</b>						
NK- celler	-	-	-	-	<b>,32**</b>	<b>,45**</b>				
IgM	-	-	-	-	-	-				
IgA	-	-	<b>-,28**</b>	<b>,26*</b>	-	-	-			
IgG	-	-	-	-	<b>,23*</b>	<b>,28*</b>	-	<b>,25*</b>	<b>,29**</b>	

Spearman korrelasjons koeffisient \*\*: p<0.01, \*; p<0.05 og – indikerer ingen korrelasjon.