

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Insuliini autoantikehade määramine lutsiferaas-  
immunopretsipitatsioon analüüsimeetodiga**

Magistritöö

30 EAP

Keiu-Anett Hellaste

Juhendaja *PhD* Koit Reimand

**TARTU 2020**

## **Insuliini autoantikehade määramine lutsiferaas-immunopretsipitatsioon analüüsi meetodiga**

Esimest tüüpi diabeedi tekkes osalevale autoimmuunmehhanismile viitavad patsiendi veres leiduvad ja T-rakulise immuunsuse mõõtmisega võrreldes suhteliselt lihtsalt määratavad autoantikehad. Nende omadusi ja diagnostilist potentsiaali on uuritud palju. Insuliini autoantikehad on esimesed autoantikehad, mis tekivad diabeedi eelses autoimmuunsuse tekkimise ja eskalatsiooni faasis. Selles töös kohandati insuliini autoantikehade (IAA) analüüsimeetodit TÜ bio- ja siirdemeditiini instituudi immunoloogia osakonna labori jaoks, valmistati uued kalibraatorid ja leiti sellele analüüsimeetodile Eesti rahvastiku valimi alusel standardhälbed ja diagnostiline läviväärtus. IAA määramine võimaldab paremini kindlaks teha I tüüpi diabeedi tekkimise protsessi vastava eelsoodumisega isikutel, samuti parandada diferentsiaaldiagnostikat erinevate diabeedi vormide vahel.

**Märksõnad:** T1D, diabeet, autoantikehad, insuliini autoantikehad, LIPS

CERCS: endokrinoloogia, sekretsioonisüsteemid, diabetoloogia, immunoloogia, diagnostika

## **Detection of insulin autoantibodies by the Luciferase Immuno Precipitation System**

The autoimmune mechanism involved in the development of type 1 diabetes is indicated by autoantibodies presented in the patient's blood that are relatively easy to detect compared to measuring T cell immunity. Insulin autoantibodies are the first autoantibodies to develop during the pre-diabetic autoimmune development and escalation phase. In this work, the method of analysis of insulin autoantibodies (IAA) was adapted for the laboratory of the Department of Immunology of the Institute of Biomedicine and Translational Medicine, UT, new calibrators were prepared and standard deviations and threshold values were found for this method of analysis based on the Estonian population. The determination of IAA makes it possible to better identify the process of developing type I diabetes in predisposed individuals, as well as to improve the differential diagnosis between various forms of diabetes.

**Keywords:** T1D, diabetes, autoantibodies, insulin autoantibodies, LIPS

CERCS: endocrinology, secreting systems, diabetology, immunology, diagnostics

# Sisukord

Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid .....	4
Kasutatud mõisted .....	5
Sissejuhatus .....	7
1 Kirjanduse ülevaade .....	8
1.1 Diabeet.....	8
1.2 I tüüpi diabeet .....	10
1.2.1 I tüüpi diabeedi patogenees .....	10
1.2.2 Autoantikehad.....	12
1.2.3 Riskitegurid .....	14
1.2.4 Epidemioloogia.....	16
1.3 Bioluminescentsmärgiste kasutamine insuliini autoantikehade uurimisel .....	17
1.3.1 Sarnased kasutusel olevad meetodid insuliini autoantikehade määramiseks .....	18
2 Eksperimentaalosa .....	20
2.1 Töö eesmärgid .....	20
2.2 Materjal ja meetodika .....	21
2.2.1 Uuritav valim.....	21
2.2.2 Insuliini autoantikehade määramine LIPS analüüsimeetodiga.....	22
2.2.3 Proteiin A agarooosi ja proteiin G agarooosi blokeerimine .....	24
2.3 Tulemused .....	26
2.4 Arutelu .....	34
Kokkuvõte .....	37
Summary.....	38
Kasutatud kirjandus .....	40
Kasutatud veebileheküljed.....	44
Lisad .....	45
Lihtlitsents .....	46

## Kasutatud lühendid

<b>AU</b>	tuletatud ühik ( <i>arbitrary unit</i> )
<b>AAK</b>	autoantikeha ( <i>autoantibody</i> )
<b>CD4+ (CD8+)</b>	diferentseerumiskobar 4 (8) positiivsed T-rakud ( <i>cluster of differentiation 4 [8]</i> )
<b>CI</b>	usaldusvahemik ( <i>confidence interval</i> )
<b>GDM</b>	rasedusaegne diabeet e gestatsioonidiabeet ( <i>gestational diabetes mellitus</i> )
<b>HFM</b>	käe-, jala- ja suutõbi ( <i>hand-foot-and-mouth disease</i> )
<b>HLA</b>	inimese leukotsüüdi antigeen ( <i>human leukocyte antigen</i> )
<b>IAA</b>	insuliini autoantikeha ( <i>insulin autoantibody</i> )
<b>ICA</b>	saarekese rakkude vastane autoantikeha ( <i>islet cell antibody</i> )
<b>IDDM</b>	insuliinist sõltuv <i>diabetes mellitus</i> ( <i>insulin-dependent diabetes mellitus</i> )
<b>LADA</b>	latentne autoimmuunne diabeet täiskasvanutel ( <i>latent autoimmune diabetes in adults</i> )
<b>LIPS</b>	lutsiferaas-immunopretsipitatsioon analüüsimeetod ( <i>Luciferase Immuno Precipitation System</i> )
<b>LU</b>	valgusühik ( <i>light unit</i> )
<b>MHC</b>	peamine koesobivuskompleks ( <i>major histocompatibility complex</i> )
<b>MODY</b>	noorte küpsuseas algav diabeet ( <i>maturity onset diabetes of the young</i> )
<b>MTP</b>	mikroitiiter plaat ( <i>microtiter plate</i> )
<b>NBS</b>	mitte spetsiifiline seondumine ( <i>non-specific bindings</i> )
<b>NHS</b>	normaalne inimese insuliin ( <i>normal human insulin</i> )
<b>NK-rakk</b>	naturaalne (loomulik) killer rakk ( <i>natural killer cell</i> )
<b>NLuc</b>	NanoLuc <sup>TM</sup> lutsiferaas (NanoLuc <sup>TM</sup> luciferase)
<b>PAS</b>	proteiin A sefaroos ehk ristseotud agaroo ( <i>protein A sepharose</i> )
<b>PC1/PC2</b>	prohormoon konvertaas 1 / 2 ( <i>prohormone convertase 1 / 2</i> )
<b>PGS</b>	proteiin G sefaroos ehk ristseotud agaroo ( <i>protein G sepharose</i> )
<b>ROC-AUC</b>	ROC-kõvera alune ala ( <i>area under the receiver operator curve</i> )
<b>T1D</b>	esimest tüüpi diabeet ( <i>type 1 diabetes</i> )
<b>T2D</b>	teist tüüpi diabeet ( <i>type 2 diabetes</i> )

## Kasutatud mõisted

**alleel** – kromosoomi lookuses paiknev geenivariant

**antigeen** – organismi tunginud võõrkeha (tavaliselt valk), mis seotakse spetsiifilise antikehaga või T-rakkude retseptoriga

**antikeha** – organismi veres või koevedelikus olev valk, mida sünteesitakse organismivõõra aine (antigeen) toimel ja mis seob seda

**autoantikeha** – autoimmuunhaiguste puhul organismis moodustuvad antikehad, mis ründavad organismi enda rakke ja kudesid

**autoimmuunsus** – immuunsus, mille korral organismi immuunreaktsioonid toimuvad oma organismi antigeenide vastu

**B-rakk** – B-lümfotsüüt, vastutavad põhiliselt antikeha vahendatud e. humoraalse immuunvastuse eest. Nad moodustavad antikehi tootvaid plasmarakke ja mõningaid muid immuunsüsteemi rakke

**C-peptiid** – C-peptiid moodustub proinsuliini molekuli jagunemisel insuliiniks ja C-peptiidiks. Iseloomustab endogeense insuliini sekretsiooni võimet

**dendriittrakud** – membranoosete jätketega rakud, toimivad antigeeni esitatavate rakkudena

**glükohemoglobiin** – hemoglobiin A alavorm, selle hulk veres näitab vereglükoosi kontsentratsiooni pikaajast tendentsi ja erütsotsüütide eluiga

**haplotüüp** – tihedalt aheldunud geneetiliste elementide nt alleelide järjestus kromosoomis, mis pärandub ühtse üksusena

**hüperglükeemia** – normist kõrgem veresuhkrutase

**hüpoglükeemia** – normist madalam veresuhkrutase

**hüperinsulineemia** – seisund, mille korral insuliini tase veres ületab normaalväärtuse. Hüperinsulineemia põhjuste pikemaajaline jätkumine kurnab insuliini tootvad kõhunäärmerakud lõpuks välja ja tekib II tüüpi suhkurtõbi

**ketoatsidoos** (diabeetiline) – ohtlik seisund, mis on põhjustatud insuliinivaegusest. Insuliinivaegusest tingituna hakkab organism lagundama rasvhappeid ja aminohappeid, ning verre kuhjub suurel hulgal ketokehasid – need on atsetoatseaat ja 3-hüdroksübutüraat

**Langerhansi saarekesed** – pankrease rakkude kogumid, mille funktsiooniks on toota insuliini ja teisi endokriinselt aktiivseid ühendeid

**lookus** – kindel koht kromosoomis, kus asub vaadeldav geen

**makrofaagid** – valged vererakud, kõige suuremad fagotsüüdid. Kõrvaldavad surnud rakkude jäänuseid, mikroobe, kasvajakke jt. Oluline roll immuunsüsteemi rakkude stimulatsioonil patogeenide vastu

**T-rakk** – T-lümfotsüüt, tüümuses küpsenud lümfotsüüt, mille rakumembraani pinnal on antigeenispetsiifiline T-raku retseptor

**β-rakud** – pankreases Langerhansi saarekestes paiknevad rakud, mille ülesandeks on sõltuvalt vere glükoosi tasemest toota ja sekreteerida insuliini

Mõistete selgitused põhinevad Ain Heinaru poolt koostatud geneetika leksikonil (Ain Heinaru) ning Immunoloogia õpiku mõistetest (Uibo, et al., 2015).

## Sissejuhatus

Diabeet (lad *diabetes mellitus*) on maailmas üha suuremat hulka inimesi puudutav haigus. Diabeet on metaboolsete haiguste rühm, mida iseloomustab hüperglükeemia, mis tuleneb insuliini sekretsiooni, insuliini resistentsusest või mõlema defektidest (American Diabetes Association, 2014). Peamiselt eristatakse kolme diabeedi vormi – I tüüpi diabeet (T1D), II tüüpi diabeet (T2D) ja gestatsioonidiabeeti (GDM) (Maailma Terviseorganisatsioon). Üheks suuremaks diabeedi kujunemise riskiteguriks on ülekaalulisus, tasakaalustamata toitumine ja vähene liikumine. Kõigist diabeedi juhtudest moodustab 90-95% teist tüüpi diabeet (American Diabetes Association, 2020).

T1D tekke põhjused ei ole täpselt teada. Olulisi seoseid on leitud inimese leukotsüütide antigeenidega (HLA), autoantikehadega (AAK), enteroviiruste ja toitumisega. Peamised viis autoantikeha, mida seostatakse T1D tekkega on saarekeste vastased antikehad (ICA), insuliini vastane autoantikeha (IAA), glutamaadi dekarboksülaasi 65kDa isovormi vastane autoantikeha (GAD65A), proteiin-türosiin fosfataasi seoseline IA-2 molekuli vastane autoantikeha (IA-2A) ja tsingi transporter 8 vastane autoantikeha (ZnT8A). Antud töös analüüsiti insuliini autoantikehasid (IAA). IAA-d on esimesed autoantikehad, mis leitakse diabeedi preventatsiooniuuringutes osalevatel patsientidel, kuid sageli need kaovad pankrease kahjustuse süvenemisel. Seetõttu ei pruugi pikaajalise T1D puhul neid enam leiduda ning sel juhul tuleb määrata teisi AAK-id (Palmer, et al., 1987).

Insuliini autoantikehade analüüsimeetod LIPS põhineb lutsiferaasiga märgistatud antigeenidel. Nanoluc on krevetist isoleeritud lutsiferaas. See on väike valk ja on stabiilsem ning heledama valgusega, kui teised lutsiferaasid. Nanoluc lutsiferaas on ensüüm, mis katalüüsib substraati furimasiin, nende koosmõjul tekib valgus, mida mõõdetakse luminomeetriga.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli kohandada insuliini autoantikehade analüüsimeetod immunoloogia osakonna laboris: leida antud meetodile uued kalibraatorid ja Eesti populatsioonile vastavad läviväärtused.

Töö on teostatud Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonna bio- ja siirdemeditsiini instituudis.

# 1 Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Diabeet

Diabeet (lad *diabetes mellitus*) on metaboolsete haiguste rühm, mida iseloomustab hüperglükeemia, mis tuleneb insuliini sekretsiooni, insuliini toime või mõlema defektidest. Diabeedi krooniline hüperglükeemia on seotud erinevate organite, eriti silmade, neerude, närvide, südame ja veresoonte pikaajalise kahjustuse tõttu tekkinud talitlushäirete ja riketega (American Diabetes Association, 2014).

Diabeedil on erinevaid vorme. I tüüpi diabeet (T1D): põhjustatud insuliini tootvate  $\beta$ -rakkude hävimisest autoimmuunkahjustuse tulemusel (Maailma Terviseorganisatsioon). Esimest tüüpi diabeet on nn insuliin-sõltuv diabeet, see tekib tavaliselt lapse- või noorukieas. Esimest tüüpi diabeedi tekkepõhjus ei ole täpselt teada, kuid geneetilised tegurid mängivad olulist rolli. Lisaks on leitud seoseid keskkonnateguritega nagu viirushaigused, endokriinsüsteemi kahjustavad kemikaalid, allergiad jne, mis võivad tekitada ebanormaalse immuunvastuse ja tekib diabeet (American Diabetes Association, 2020). I tüüpi diabeet jaotatakse alagruppideks – 1a tüüp ehk autoimmuunne ja 1b tüüp ehk idiopaatiline (Lubi, 2006). Immuunvahendatud ehk autoimmuunprotsessidest põhjustatud  $\beta$ -rakkude hävinemisega on seotud umbes 85-95% I tüüpi diabeedi juhtudest. Ülejäänud juhtudel on tegu idiopaatilise diabeediga, mille sümptomid on sarnased 1a tüübile aga nende puhul ei ole täpset etioloogiat ning patogeneesi teada. 1b tüüp ei ole seotud immuunsüsteemiga (Lutsar, et al., 2013). Lisaks kuulub I tüüpi diabeedi alla LADA (ingl *Latent Autoimmune Diabetes in Adults*), see algab täiskasvanueas ja on aeglase kuluga I tüüpi diabeet (Naik, et al., 2009).

II tüüpi diabeet (T2D): põhjustatud insuliini mõju nõrgenemise tõttu ehk tekib insuliiniresistentsus, samas võib põhjuseks olla ka insuliini eritumise häire või mõlemad põhjused koos (Maailma Terviseorganisatsioon). II tüüpi diabeedi alla kuulub ka MODY (ingl *Maturity Onset Diabetes of the Young*), mis algab noorukieas, enne 25-eluaastat, see on pärilik autosoom-dominante diabeet, mille põhjuseks on kõhunäärme defekt sekreteerida insuliini (Anik, et al., 2015).

Rasedusaegset diabeeti (GDM) põhjustavad hormonaalsed muutused naise organismis, mis suurendavad insuliinivajadust. Selle puhul on tegemist raseduse aegse süsivesikute ainevahetushäirega. GDM tekib tavaliselt raseduse viimasel trimestril, enamasti diagnoositakse



rutiinsete vereanalüüsidega glükoosi taset mõõtes ning märgatavaid diabeedi sümptomeid ei teki. Umbes 6 nädalat peale sünnitust veresuhkru tase normaliseerub iseenesest. Lisaks on leitud, et GDM põdenud naistel on suurenenud risk T2D tekkeks. Samuti on järglastel, kelle ema on raseduse ajal põdenud GDM, suurem risk ülekaalulisusele ja T2D tekkeks (Lutsar, et al., 2013).

Muudest põhjustest tulenev diabeet: põhjustatud kilpnäärme funktsiooni häiretest, hormonaalsetest häiretest, raua ainevahetushäire tõttu, ravimitest ja mürkidest põhjustatud diabeet, infektsioonid, teatud geneetiliste sündroomidega seotud diabeet (Maailma Terviseorganisatsioon). Peale selle eristatakse kahte tüüpi hüperglükeemia eelset seisundit – glükoositaluvuse häire (ingl *impaired glucose tolerance*, IGT), mis seisneb selles, et söömise järgselt tekib kerge veresuhkru taseme tõus. Ja glükeemia ehk paastuglükoosi häire (ingl *impaired fasting glucose*, IFG), mis seisneb tühja kõhuga kergelt kõrgeenenud veresuhkru tasemes. Need kaks seisundit võivad viidata suurenenud T2D tekke riskile. Samas saab seda riski nende seisundite puhul vähendada kehakaalu alandamisega ja elustiili muutusega (Lutsar, et al., 2013).

Üheks suuremaks diabeedi kujunemise riskiteguriks on ülekaalulisus, tasakaalustamata toitumine ja vähene liikumine. Kõigist diabeedi juhtudest moodustab 90-95% teist tüüpi diabeet (American Diabetes Association, 2020).

## 1.2 I tüüpi diabeet

### 1.2.1 I tüüpi diabeedi patogenees

I tüüpi diabeet on autoimmuunse reaktsiooni tulemus, mille puhul insuliini tootvad pankrease rakud hävitatakse (Faideau, et al., 2005).  $\beta$ -rakkude vastane autoimmuunsuse teke ja eskaleerumine algab tavaliselt mitu aastat enne kliinilise T1D ilmnemist, see toimub diabeedi eelse asümptomaatilise perioodi jooksul. Saarekeste vastased autoantikehad on esimesed autoantikehad, mis leitakse diabeedi preventatsiooniuuringutes (Palmer, et al., 1987). Kliiniliste sümptomite avaldumisel on tavaliselt juba 60-80%  $\beta$ -rakkudest hävinenud (Notkins ja Lernmark, 2001). T1D puhul on tegemist kroonilise autoimmuunse põletikulise protsessiga, kus lümfotsüüdid ja makrofaagid infiltreeruvad pankrease saarekestesse, põhjustavad seal  $\beta$ -rakkude autoimmuunse kahjustuse (Yoon ja Jun, 2006). Infiltraat koosneb CD8+ ja CD4+ T-rakkudest ja B-rakkudest, millest enamus on CD8+ rakud. Infiltraadis on ka NK-rakke ja dendriittrakke (Yoon ja Jun, 2005). Lisaks on leitud infiltraadist CD20+ B-lümfotsüüte, selle rakupopulatsiooni kõrge osakaal esineb patsientidel, kellel on T1D diagnoositud enne 7-aastaseks saamist. Üle 13-aastastel on leitud, et CD20+ rakkude sisaldus infiltraadis on tunduvalt vähenenud (Rewers ja Ludvigsson, 2016). B-lümfotsüüdid mängivad rolli antigeeni esitlevate rakkudena ja on näidatud, et T-rakkudel on oma osa  $\beta$ -rakkude hävitamises.  $\beta$ -rakud hävitatakse apoptoosi teel. Apoptoosis on tähtis osa Fas-Fas ligandi ja TNF-TNF retseptori interaktsioonidel ning tsütotoksilistest T-rakkudest vabanenud ensüümidel ja perforiinil. Ka aktiveeritud makrofaagid ja T-rakud ning nende sekreteeritud tsütokiinid hävitavad  $\beta$ -rakke. Nende protsesside tulemuseks on autoimmuunse patogeneesiga T1D (Yoon ja Jun, 2006).

$\beta$ -rakkude funktsioon on reguleerida glükoosi taset veres. Neil rakkudel on võime tunnetada glükoosi taset veres ja vastavalt sellele vabastada insuliini. Sellega säilitatakse füsioloogiline glükoositase suhteliselt kitsas vahemikus.  $\beta$ -rakkude hävimisel kaotab I tüüpi diabeediga patsient vere glükoosisisalduse üle kontrolli, mis võib viia väga tõsiste haigusseisunditeni, näiteks ketoatsidoos ja raske hüpo- ja hüperglükeemia. Sekundaarsed tüsistused võivad olla südamehaigused, pimedus ja neerupuudulikkus (Bluestone, et al., 2010).

Hetkel tuvastatakse Eestis diabeeti vastavalt Maailma Terviseorganisatsiooni (WHO) poolt soovitatud diabeedi diagnostilistele kriteeriumitele. Diabeet diagnoositakse, kui patsiendil on paastuplasma glükoosi tase  $\geq 7,0$  mmol/l, hüperglükeemia sümptomaatika ja mistahes ajahetkel mõõdetud plasmaglükoos  $\geq 11,1$  mmol/l, glükoositaluvuse testis 2 tundi pärast 75g glükoosi

suukaudset manustamist glükoosi tase plasmas  $\geq 11,1$  mmol/l või glükohemoglobiin (HbA1c)  $\geq 48$  mmol/l või  $\geq 6,5\%$  - kogu hemoglobiinist. Antud väärtused on mõõdetud venoosest plasmast, kapillaarvere glükoosi mõõtmine ei sobi diabeedi diagnoosimiseks (Ambos, et al., 2016). Nende diagnostiliste kriteeriumitega ei saa aga eristada T1D ja T2D.

T1D ja T2D eristamise üheks kliiniliseks võimaluseks on seerumi C-peptiidi taseme määramine. C-peptiid tekib, kui pankrease Langerhansi saarekeste  $\beta$ -rakkudes sünteesitud proinsuliini molekul jaguneb insuliiniks ja C-peptiidiks. C-peptiid satub verre võrdses koguses insuliiniga ehk C-peptiidi tase vereseerumis näitab endogeense insuliini sekretsiooni võimet. T1D puhul on C-peptiidi väärtused madalad, T2D puhul aga kõrged, mis viitab insuliini resistentsusele ja hüperinsulineemiale. Referentsväärtus  $\geq 18$  aastastel on 0,37-1,47 nmol/L (Lehtme, R.).

## 1.2.2 Autoantikehad

Esimest tüüpi diabeedi tekkes osalevale autoimmuunmehhanismile viitavad patsientide veres leiduvad ja määratavad autoantikehad (AAK). Põhilised autoantikehad on saarekeste rakkude vastane autoantikeha (ingl *pancreatic islet cell antibodies*, ICA), insuliini vastane autoantikeha (IAA), glutamaadi dekarboksülaasi 65kDa isovormi vastane autoantikeha (GAD65A), proteiintürosiin fosfataasi seoseline IA-2 molekuli vastane autoantikeha (IA-2A) ja tsingi transporter 8 vastane autoantikeha (ZnT8A) (Lampasona ja Liberati, 2016). Mitmed uuringud on näidanud, et püsivalt positiivne antikehade olemasolul võib ennustada T1D arengut. Kui mõõdetakse nelja markerit/autoantikeha, st GAD65A, IA-2A, IAA ja ZnT8A, on alla 10% T1D-ga patsientidel kõik neli autoantikeha negatiivsed, vähem kui 10% on ainult üks marker ja umbes 70% on kolm või neli markerit. Mitmete antikehade esinemine koos on seotud diabeedi kõrgema tekkeriskiga, samas kui ühe saarerakkudega seotud autoantikeha esinemine on tavaliselt madala ennustava väärtusega (Zhang ja Eisenbarth, 2010).

Saarekeste rakkude vastased autoantikehad (ICA) on AAK kogum, mida seostatakse T1D-ga. ICA sihtantigeenideks on pankrease endokriinrakkude tsütoplasmaatilised komponendid. ICA reageerib Langerhansi saarekeste kõigi rakutüüpidega. Määratakse kaudse immunofluoresentsmeetodiga (Metsküla, 2019). Kõrge ICA tiiter korreleerub patsiendi sugulaste suurenenud diabeediriskiga (Zhang ja Eisenbarth, 2010).

GAD65 on üks peamisi T1D autoantigeene. GAD on ensüüm, millel on oluline roll kesknärvisüsteemi inhibiitori  $\gamma$ -aminovõihappe (GABA) sünteesis. GAD paikneb  $\beta$ -rakkudes sünaptilistesarnastes mikrovesiikulites (ingl *synaptic-like microvesicles in  $\beta$  cells*). Lisaks sellele on GAD ekspresseerunud ka imetajate munandites, munasarjades, tüümuses ja ajus, inimesel on lisaks pankrease  $\alpha$ ,  $\delta$  ja polüpeptiide tootvates (ingl *polypeptide producing*) rakkudes. GAD-i on kaks erinevate geenide poolt kodeeritud isovormi, GAD67 ja GAD65. (Yoon ja Jun, 2006). GAD65A esineb 70% uutest T1D juhtumistes (Zhang ja Eisenbarth, 2010). Sagedamini on GAD65 autoantikehad leitavad täiskasvanutel ja neid seostatakse aeglasema T1D tekke kuluga. Lisaks on GAD65A täiskasvanute latentse autoimmuunse diabeedi (LADA) üheks tunnusjooneks (Lampasona ja Liberati, 2016).

Insuliin (IAA – *insulin autoantibodies*) on ainuke  $\beta$ -rakkude spetsiifiline antigeen T1D puhul (Lampasona ja Liberati, 2016). IAA võivad ilmned juba väga varases eas. Need on esimesed autoantikehad, mis tekivad diabeedi eelses faasis ning tänu nendele tuvastatakse T1D tekkimise

protsess väikelastel (Herawati, et al., 2017), kuid IAAd kaovad pankrease kahjustuse süvenemisel (Palmer, et al., 1987). Samas kõikidel IAA positiivsetel isikutel ei arene välja T1D. Lastel, kellel ei teki teisi  $\beta$ -rakkude autoantikehi, ei pruugi tekkida T1D (Herawati, et al., 2017). IAA, erinevalt GAD65A või IA-2A, ei sobi biomarkerina kasutamiseks peale eksogeense insuliinravi alustamist, sest patsientidel võib eksogeense insuliini suhtes tekkida immuunvastus ja insuliini antikehad (Notkins ja Lernmark, 2001).

IA-2 on retseptortüüpi valk, mille bioloogiline tähtsus ei ole veel lõplikult teada, aga mis on üks peamisi autoantigeene I tüüpi diabeedi korral. IA-2 on ensümaatilisel mitteaktiivne transmembraanse valgu türosiini fosfataasi (PTP) perekonnaliige. See valk asub sekretoorsetes vesiikulites ja osaleb insuliini eritumise reguleerimises (Hu, et al., 2005). IA-2 vastaste AAK kontsentratsioon langeb haiguse progresseerudes, seetõttu esineb IA-2A rohkem lastel ja teismelistel (Kulmala, et al., 2000).

ZnT8 on neljast peamisest autoantigeenist kõige viimasena identifitseeritud T1D autoantigeen. See valk asub saarekese beetarakkude insuliini graanulite membraanides. ZnT8 valk osaleb aktiivselt insuliini sünteesis ja sekretsioonis (Huang, et al., 2013). Lisaks on tsingil oluline ülesanne insuliini hoiustamiselt. Tsingi sisaldus pankrease saarekete  $\beta$ -rakkudes on inimkehas üks kõrgemaid (Chimienti, et al., 2005).

Insuliini antikehad (IA) tekivad neil patsientidel, kes on alustanud eksogeense insuliinraviga. Umbes 78-98% patsientidel esinesid IA peale insuliinravi alustamist. Eksogeenne insuliin võib olla immunogeenne. IA mõjutab insuliini mõõtmise tulemust, kuna IA toimib siduvate valkudena ja insuliini immuuntestid mõõdavad nii seotud kui ka vaba insuliini. Insuliini mõõtmine insuliinraviga alustanud patsientidel on väga keeruline, seega IA olemasolul ei soovitata insuliini mõõta. Mõned uuringud on näidanud, et IA võib põhjustada hüpo- või hüperglükeemiat ehk düsglükeemiat. Aga need juhud on pigem harvaesinevad (Pittman, D. 2017).

### 1.2.3 Riskitegurid

#### Geneetiline taust

T1D-il on tugev geneetiline taust, esimese astme sugulastel on suurem risk T1D tekkeks, kui populatsioonis keskmiselt. T1D isiku õel või vennal on suurem tõenäosus haigestuda T1D-i kui näiteks T1D isiku järglastel. Homosügootsetel kaksikutel on vastav tõenäosus 50% (Zhang ja Eisenbarth, 2010). Algselt leiti T1D geneetilise eelsoodumuse kohta seosed inimese leukotsüütide antigeeni (HLA) piirkonnaga, mida kirjeldati juba 1974. aastal Cudworthi ja Woodrow'i poolt. HLA regioon asub kuuenda kromosoomi lühikeses õlas (6p21.3) (Noble ja Erlich, 2012). Klassikalised I (A, B, C) ja II klassi (DP, DR, DQ) HLA molekulid ankuravad valgulistest antigenidest tekkinud peptiide ja esitavad neid äratundmiseks T-raku retseptoritele. HLA funktsioon on aidata immuunsüsteemil vahet teha oma ja võõra vahel (Nyaga, et al., 2018). Ainult mõningad HLA regioonis paiknevad geenid on seotud immuunvastuse tekitamisega, nendeks on geenid, mis kodeerivad klassikalisi HLA klass I (A, B, C) ja klass II (DR, DQ, DP) molekule. T1D tekkimisega on seotud kõige tugevamalt HLA II klassi geenide alleelid (Ounissi-Benkalha ja Polychronakos, 2008). Esmalt leiti T1D tugev seos HLA klass II DR molekulidega ja hiljem DQ molekulidega (Notkins ja Lernmark, 2001). Kaks peamist HLA II haplotüüpi, mis on leitud 90% T1D patsientidel on DR4-DQ8 ja DR3-DQ2 (Ounissi-Benkalha ja Polychronakos, 2008). DQ molekuli kodeerivad kaks polümorfset geeni ( $\alpha$  ja  $\beta$ ) ja igale  $\alpha$  ja  $\beta$  geeni alleelile on antud 4-kohaline number, vastavalt geenile ja alleelile. Kaks peamist kõrge riski varianti on DQ8-DQA1\*0301 koos DQB1\*0302 ja DQ2-DQA1\*0501 koos DQB1\*0501 (Zhang ja Eisenbarth, 2010). Isikul kellel esineb DQ8 (DQA1\*0301, DQB1\*0302) alleel, siis see suurendab 11 korda tõenäosust T1D tekkeks (Nyaga, et al., 2018). Geenid, mis kodeerivad klassikalisi HLA klassi I ja klassi II molekule külgnevad kromosoomipiirkonnaga, millele on mõnikord viidatud kui "III klassi piirkonnale", need sisaldavad immunoloogiliselt olulisi gene (nt tuumori nekroosifaktor [TNFA]) (Noble ja Erlich, 2012). Ka nendel geenidel on oma panus T1D patogeneesis, näiteks võib komplemendi komponendi C4 geeni polümorfism suurendada T1D tekke riski DR3/DR4 serotüüpe omavatel noorukitel (Nyaga, et al., 2018).

Lisaks on selged seosed kindla HLA haplotüübi ja saarekeste autoantikehade tekke vahel. GADA seostatakse HLA DR3-DQ2 haplotüübiga, IAA ja IA-2A seostatakse DR4-DQ8 haplotüübiga (Lampasona ja Liberati, 2016).

On olemas mõningad haplotüübid, mis vastupidiselt riskialleliledele kaitsevad T1D eest. Kõige suurema kaitsega haplotüüp on DRB1\*1501-DQB1\*0602, mida leidub 15% kogu populatsioonist (Buzzetti, et al., 2016).

Peale HLA regioonis paiknevate geenilookuste on olemas ka üle 40 lookuse, mis suurendavad T1D tekkimise tõenäosust. Kõige paremini kirjeldatud mitte-HLA lookused on insuliin (INS), tsütotoksilise T-lümfotsüüdi antigeen (CTLA-4) ja valgu türosiini fosfataas, tüüp 22 mitteretseptor (PTPN22). Mitme riskialleeli koosesinemisel on oluliselt kõrgem risk T1D-ks. Seda esineb väga väikesel osal üldpopulatsioonis (Buzzetti, et al., 2016).

### Keskkonnategurid

T1D haigestumine ja levimus väikelaste seas on kasvutendentsiga mitmetes riikides. Paranenud hügieeni- ja elutingimused on vähendanud lapsepõlves väliskeskonna antigeenide, sealhulgas infektsioonitekitajate antigeenidega kokkupuutumise sagedust, mis omakorda viib immuunsüsteemi muutusteni ja suurendab autoimmuunhaiguste ja allergiate nagu näiteks T1D või astma tekkimise riski (D'Angeli, et al., 2010).

Uuringud on näidanud, et viirushaigused on seotud T1D tekkimisega. Seoseid on leitud leetritega, mis on aga suudetud elimineerida tänu vaktsiinile. Enteroviiruseid on seostatud T1D tekkimisega. Enteroviiruste perekonda kuuluvad ECHO-, Coxsackie A- ja B-viirused, polioviirused ning muud enteroviirused. Enteroviirused on väikesed RNA genoomiga viirused, kuuluvad pikornaviiruste sugukonda (Akerblom, et al., 2002). Nendel viirustel on tropism inimese pankrease saarekeste suhtes *in vivo* ja *in vitro* katsetes. Inimestel, kellel on hiljuti diagnoositud T1D, on leitud kõhunäärmes enteroviirusi (Rewers ja Ludvigsson, 2016). Enteroviirusinfektsioonid on sagedased laste ja noorukite seas. Nakkus võib põhjustada HFM (*hand-foot-and-mouth disease*), herpangiini, stomatiiti ja teisi haigusi, raskematel juhtudel ka meningiiti (Akerblom, et al., 2002). Uuringute põhjal on järeldatud, et enteroviirusnakkus raseduse ajal võib põhjustada püsivat infektsiooni ja saarekeste autoimmuunsust emal ja järglasel (Rewers ja Ludvigsson, 2016).

Üheks suuremaks keskkonnategurite grupiks arvatakse olevat toitumine. On leitud seos tsöliaakia ja T1D vahel, kuna mõlemad haigused on seotud samade HLA II klassi kuuluvate riskialleelidega. On näidatud, et pikaajaline gluteenivaba dieet parandas insuliini sekretsiooni

(Akerblom, et al., 2002). Kaitsvat seost on leitud rinnapiimaga toitmisel. Lastel, keda imetati veel teravilja menüüsse lisamise ajal, oli vähenenud saarekeste autoimmuunsuse oht ja T1D risk (Rewers ja Ludvigsson, 2016).

Esimest tüüpi diabeedi keskkonnategurite parem mõistmine võib aidata leida võimalusi haigust ära hoida, teket aeglustada või edasi lükata.

#### **1.2.4 Epidemioloogia**

Viimaste andmete põhjal aastal 2017 oli maailmas 425 miljonit inimest diabeedi diagnoosiga, neist pea 85% põeb teist tüüpi diabeeti ja ülejäänud 15% esimest tüüpi diabeeti. Esimest tüüpi diabeet võib tekkida igas vanuses. Enamikes populatsioonides haigusjuhud kujunevad välja puberteedi eaks. Mõned ka hiljem, mida nimetatakse LADA-ks (*Latent Autoimmune Diabetes in Adults*). Esimest tüüpi diabeeti diagnoositakse maailmas üle 96 000 noorukil aastas, kelle vanus on 0-15 aastat. See arv kasvab igal aastal 3%. Kõige suurem haigestumine on kõige nooremas vanuserühmas, kuhu kuuluvad kuni nelja aastased lapsed. Kõige suuremad uute haigusjuhtumite arvud on USAs, Indias, Brasiilias, Hiinas, UKs, Vene Föderatsioonis, Algerias, Saudi Araabias, Nigeerias ja Saksamaal, kus kokku diagnoositakse pea 60% uutest juhtudest (Forouhi ja Wareham, 2019).

Eestis on ligikaudu 7000 esimest tüüpi diabeeti põdevat inimest, teist tüüpi diabeeti põeb 60 000-65 000 inimest (Eesti Diabeediliit). Esimest tüüpi diabeedi uusi haigusjuhte diagnoositi 2014. aastal 567 inimesel. Enim haigestumisi esimest tüüpi diabeeti on olnud vanuses 10-14 aastat. Kõige väiksem on haigestumine 0-4 aastaste vanusegrupis, kuid selles vanusegrupis on viimastel aastatel märgata kasvutendentsi. Üldiselt on olnud uusi haigusjuhte igal aastal võrdselt. Suurem osa haigestunuid on kuni 19. aastased (Paat-Ahi ja Nurm, 2017). Tervise Arengu Instituudi tervisestatistika andmebaasi järgi diagnoositi 2016. aastal 100 000 elaniku kohta 43,0 juhtu. Vanuserühmade jaotus on välja toodud tabelis 1. Andmebaas põhineb tervishoitudöötajate poolt raporteeritud andmetel (Tervise Arengu Instituut, 2017).

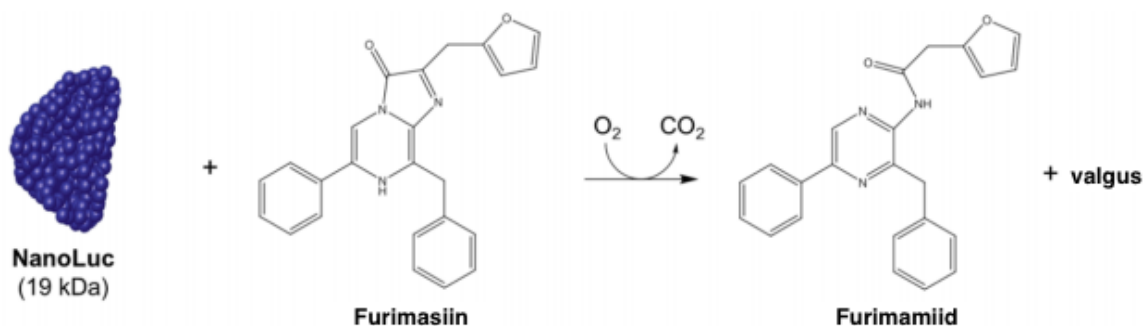


Tabel 1. (Tervise Arengu Insituut, 2017)

<b>Vanuserühm</b>	<b>Uusi T1D haigusjuhtumeid/ 100 000 elaniku kohta (2016 a.)</b>
<b>1-4</b>	10,7
<b>5-9</b>	41,7
<b>10-14</b>	44,3
<b>15-19</b>	38,5
<b>20-24</b>	40
<b>25-34</b>	39,5

### **1.3 Bioluminestsentsmärgiste kasutamine insuliini autoantikehade uurimisel**

Bioluminestsentsvalgus on valgus, mis on tekitatud mõningate elusorganismide poolt. See on keemiline protsess, mis põhineb ensüümi ja substraadi interaktsioonidel, mille tagajärjel tekib valgus. Bioluminestsentsi tekkeks vajalikke ensüüme nimetatakse lutsiferaasideks ja substraat on lutsiferaasi tüübist (England, et al., 2016). Lutsiferaasi immuunsadestamise süsteemi (Luciferase Immuno Precipitation System) on tehnoloogia, mis põhineb laboriorganismides toodetud lutsiferaasiga märgistatud antigeenidel (Burbelo, et al., 2015). Antud töös on kasutatud NanoLuc (Nluc) lutsiferaasi LIPSi tehnoloogias. Nluc valk on väiksema suurusega, tagab kõrgema analüütilise tundlikkuse ja on stabiilsem kui teised tuntud bioluminestsentsreporterid Firefly või Renilla lutsiferaasid. Nluc on arendatud ja toodetud Promega firma poolt. Nluc on 19,1 kDa, ATP-st sõltuv ensüüm, mis on isoleeritud süvameres elavast krevetist *Oplophorus gracilirostris*. NLuc on modifitseeritud ensüüm, mis katalüüsib substraati nimega furimasiin, mida on vaja valguse tekitamiseks/tootmiseks. Lisaks on vaja oksüdatsioonireaktsiooni, et tekiks valgus (joonis 1.). Nluc koos oma substraadiga, milleks on sünteetiline imidasopüraasinoon (*imidazopyrazinone*) substraat furimasiin, tekitab 150 korda heledama/võimsama signaali kui näiteks FFluc (FireFly luciferase) (Loh ja Proft, 2013).



Joonis 1. Bioluminestsents NanoLuc süsteemis tekib siis kui optimeeritud substraat, mida nimetatakse furimasiiniks, reageerib NLuc-iga molekulaarse hapniku juuresolekul. Produktina eraldub furimamiid ja valgus. (England, et al., 2016).

Antud töös on kasutatud rekombinantset lutsiferaasiga märgistatud antigeeni. NanoLuc™ (NLuc) lutsiferaasi reporteriga märgistatud rekombinantse proinsuliini antigeeni subklooniti modifitseeritud pCMVTNT™ vektorisse (Promega). Lutsiferaasiga märgistatud insuliinide ekspresseerimiseks asendati PC1/PC2 konvertaasi äratundmiskohad furiini konvertaaside omadega, võimaldades C-peptiidi lõhustamist. Antigeenid ekspresseeriti transfekteerimisel Expi293F™ rakkudes (Expi293™ ekspressioonisüsteem, Thermo Fisher Scientific Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). 48 tunni möödudes eraldati rakud tsentrifuugimisega ja kogutud kasvatamissööde hoiustatakse ühekordse kasutusega alikvootidena -80C juures (Liberati, et al., 2017). See osa ei ole tehtud immunoloogia laboris.

Käesolevas magistritöös on kasutatud IAA LIPS meetodit, mis põhineb B-ahela NLuc proinsuliinil, kus on insuliini B-ahela C-terminuse otsa on klondeeritud NLuc (Liberati, et al., 2017).

### 1.3.1 Sarnased kasutusel olevad meetodid insuliini autoantikehade määramiseks

Üks kasutusel olevatest analüüsimeetoditest IAA määramiseks on RBA (ingl *radiobinding assay* e *RIP - radioimmunoprecipitation*). Seda analüüsi kasutatakse tuvastamiseks autoantikehi diabeedi haigetel. Meetodi puhul seonduvad uuritavas proovis olevad antikehad radioaktiivselt märgistatud antigeeniga. Vedelikfaasis tekkivad antikeha-antigeen kompleksid sadestatakse tavaliselt proteiin A agarosiga (PAS) või proteiin G agarosiga partiklitega (PGS). Seondumata antigeen pestakse välja ja autoantikeha kompleksiga seondunud PAS-ile lisatakse

stsintillatsiooni vedelik. Lõpuks mõõdetakse tulemused stsintillatsiooni ja luminesentsi loenduriga (Fida ja Rowley, 1998).

## **2 Eksperimentaalosa**

### **2.1 Töö eesmärgid**

Antud magistritöö eesmärgiks oli kohandada insuliini autoantikehade analüüsimeetod Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonna bio- ja siirdemeditsiini instituudis immunoloogia osakonna laboris.

1. Uued kalibraatorid – valmistamine ja optimeerimine
2. Leida sellele analüüsimeetodile Eesti rahvastiku valimi alusel optimaalne diagnostiline läviväärtus

## **2.2 Materjal ja metoodika**

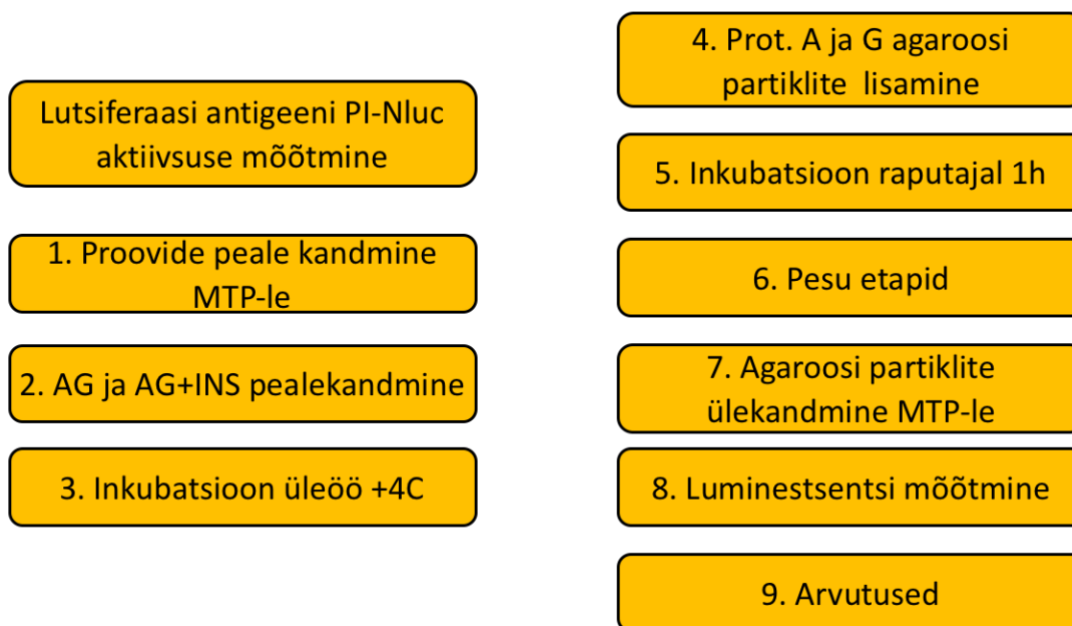
### **2.2.1 Uuritav valim**

Antud magistritöö põhineb Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonna bio- ja siirdemeditsiini instituudis immunoloogia osakonna Eesti diabeedi uuringute programmi proovidel. Selle programmi proove on kogutud vahemikus märts 2008 kuni märts 2020.

Magistritöö valimi moodustas 303 uuritavat, kelle hulgas terveid (st ilma diabeedita) kontrollisikuid (edasipidi: kontrolle) oli 204 (67,33%) ja haigeid 99 (32,67%). Kontrollide seas oli mehi 67 (32,84%) ja naisi 137 (67,16%). Haigete seas oli mehi 56 (56,57%) ja naisi 43 (43,43%). Insuliini autoantikehi määrati vereseerumitest, neid hoiustati -80C juures. Käesoleva töö proovid ja andmed on pärit vahemikust märts 2008 kuni veebruar 2019.

## 2.2.2 Insuliini autoantikehade määramine LIPS analüüsimeetodiga

Antud meetod on saadud Vito Lampasona laborist Milanost (Liberati, et al., 2018) ja kohandatud Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonna bio- ja siirdemeditsiini instituudis immunoloogia labori jaoks. Üleüldine kava on kujutatud joonisel 2.



Joonis 2. LIPS meetodi üldine kava.

Vito Lampasona käest saadud proinsuliini antigeen lahjendati TBT (Tris puhver koos Tweeniga 1%-line) puhvriga, et saavutada lutsiferaasi aktiivsuse kontsentratsioon  $10 \times 10^6$  LU/kaevu (ingl *well*) kohta. Selleks kasutati 1,5ml eppendorfi, tehti lahus - 1ml TBT + 5 $\mu$ l antigeeni. Seejärel filtreeriti, et eemaldada agregeerunud antigeen, teise 1,5ml eppendorfi. Filtreerimiseks kasutati insuliinisüstalt ja 0,2 $\mu$ m filtrit. 15ml tuubi valmistati TBT ja filtreeritud antigeenilahuse segu. Vastavalt antigeeni proinsuliini (PI) kontsentratsioonist tehti lahjendus, et saada teoreetiline kontsentratsioon  $10 \times 10^6$  LU/20 $\mu$ l. Lahjendatud antigeeni lahust pipeteeriti 20 $\mu$ l mikrotiiter plaadi Optiplate™ (PerkinElmer) kahte kaevu, kaks paralleeli. Lisaks tehti 1,5ml eppendorfi Nano-Glo® substraadi + Nano-Glo® puhvri (NGB) segu, 1 kaevu jaoks 40 $\mu$ l NGB + 0,8 $\mu$ l substraati (Nano-Glo® Luciferase Assay, N1120, Promega). NB! Substraat on valgustundlik (fototundlik), seega tuleb selle lahuse jaoks eppendorf katta näiteks fooliumiga. Luminestsentsi mõõtmine toimus Perkin Elmer, Wallac MicroBeta TriLux, 1450 LSC &

luminescence counter luminomeetriga. Saavutatud kontsentratsiooni järel võib jätkata analüüsiga.

Iga seerumi neli 2 $\mu$ L kordust pipeteeriti 96-sügava süvendiga mikrotiiter plaatidele (ingl *96-deep-well plates*). Pooltele replikaatidele lisati 25  $\mu$ l antigeeni ilma „külma“ insuliinita (ingl „cold“ *insulin*, märgistamata insuliin), ülejäänud said antigeeni koos „külma“ insuliiniga. „Külma“ insuliini hulk ühe kaevu kohta oli 20ng.

Plaat kaeti fooliumiga kuivamise vältimiseks, tsentrifuugiti 3' raskuskiirendusega 500g temperatuuril +4°C, segati hetkeks raputaja peal 750rpm ja inkubeeriti üleöö +4°C juures.

Immuunkompleksid haarati inkubeerimise teel blokeeritud proteiin A ja G agarosiga. Valmistati PAS ja PGS lahus (Proteiin A ja G agarosid), mis on eelnevalt blokeeritud. Ühe kaevu jaoks 5 $\mu$ l 50% PGS + 10 $\mu$ l 50% PAS + 35 $\mu$ l TBT, kokku 50 $\mu$ l iga kaevu jaoks. Segati korralikult ja tsentrifuugiti 3' kiirusel 500g temperatuuril +4°C ja pesti TBT-ga 3 korda. Kõik etapid tehti jää. Peale esimest tsentrifuugimist märgiti ära lahuse nivoo, et peale viimast pesu jääks sama palju TBT ja sefaroosi segu. Pesu – TBT peale, tsentrifuugiti, aspireeriti vedelik sefaroosi pealt ja siis uuesti TBT peale. 50 $\mu$ l/kaevu kohta PAS ja PGS lahust lisati proovidega kaetud 96-sügava süvendiga mikrotiiter plaadile, tsentrifuugiti 3' raskuskiirendusel 500g temperatuuril +4°C, inkubeeriti 1h +4°C raputaja peal.

Plaate pesti viis korda jääkülma TBT-ga, 750 $\mu$ l iga kaevu kohta. Pesude vahel tsentrifuugiti 3' raskuskiirendusel 500g temperatuuril +4°C. Pesuvedelik aspireeriti spetsiaalse 12-kanalise abivahendiga.

Proovid tõsteti (koos agarosiga) 96 sügava süvendiga mikrotiiter plaadilt teisele Optiplatet<sup>TM</sup> MTP-le mõõtmiseks. Kontrolliti, et kõik sefaroosi osakesed on korralikult üle kantud. Lõplik kogus MTP-l on 50 $\mu$ l/kaevu kohta.

Enne mõõtmist tehti valmis NLuc substraadi ja puhvri segu (40 $\mu$ l puhvrit + 0,8 $\mu$ l substraati iga kaevu kohta). See peab olema toatemperatuuril ja anum kaetud fooliumiga, et valgust ei saaks. NLuc ja puhvri segu kanti proovidele peale ja mõõdeti lutsiferaasi aktiivsust luminomeetriga.

Kõikides inkubatsiooni- ja pesuetappides kasutasin puhvrina TBT-d (50mM Tris, pH 8, 1% Tween). TBT 2L puhvri valmistamiseks on vaja 12,12g Trizma Base (Tris), 2L dH<sub>2</sub>O, 10ml HCl (peab olema pH 8 juures) ja 20ml Tween 20. Puhver peab olema jääkülma enne kasutamist. Puhvrit säilitati +4C juures ja pimedas.

### 2.2.3 Proteiin A agaroosi ja proteiin G agaroosi blokeerimine

Proteiin A agaroosi ja proteiin G agaroosi blokeerimine on vajalik selleks, et minimeerida mittespetsiifilist seondumist (ingl *non specific binding*). Insuliini autoantikehade analüüsidest võib mittespetsiifilist seostumist proteiin A sefaroos ja proteiin G sefaroosiga vähendada glütsiini või etanoolamiiniga eeltöötlemisega (Hamzehlou, et al., 2015). IAA tase on tavaliselt üsna madal vereseerumis, seega mitte-spetsiifiline sidumine (NSB) tuleb viia miinimumini, et analüüsimeetod saavutaks maksimaalse tundlikkuse ja spetsiifilisuse. Eeltöötlemine glütsiini või etanoolamiiniga võimaldab tundlikes IAA analüüsidest kasutada nõ halbu PAS või PGS partiid, parandades nii meetodi stabiilsust ja mõõdetava tulemuse täpsust (Williams, et al., 2006).

PAS-i blokeerimine glütsiiniga. 0,5L TBT/glütsiini puhvri tegemiseks läheb vaja 3,03 g Trizma Base (Tris), 9,705g glütsiini, 0,5L dH<sub>2</sub>O, 20-25 ml NaOH (5M) see peab olema pH 10,6 juures ja 5 ml Tween20. 1L 0,9% soolalahuse tegemiseks läheb vaja 9g NaCl ja 1L dH<sub>2</sub>O. NaOH tegemiseks lisati aeglaselt NaOH graanulid vette tõmbekapi all ja oodati kuni graanulid on täielikult lahustunud. 100g NaOH läheb vaja 500mL 5M naatriumhüdroksiidi jaoks.

PAS ettevalmistus. 10ml 80% PAS lahust pandi igasse 50ml falkonisse ja pesti 2 korda soolalahusega. Peale teist pesu, pesti 1 kord TBT/glütsiini puhvriga. Peale TBT/glütsiini pesu, aspireeriti vedelik ära ja lisati 50ml TBT/glütsiini puhvrit igasse tuubi. Tuubid pandi segajasse (ingl *roller*) 42 rpm juures üleöö inkubeerima, 24h. Peale inkubatsiooni eemaldati tuubid segajast, tsentrifuugiti põhja, kallati TBT/glütsiini puhver ära ja pesti 1 korra TB puhvriga (ilma tweenita). Pesti 3 korda steriilse soolalahusega. Peale kolmandat pesu aspireeriti pesu puhver. Lõpuks valmistati 50% suspensioon koos steriilse soolalahusega, mis sisaldab 20% EtOH. PAS säilib soola/EtOH lahuses stabiilsena +4C juures.

PGS-i blokeerimine etanoolamiiniga. 18,8ml dH<sub>2</sub>O lisati 1,2ml etanoolamiini. Lahjendati 1:5 TBT puhvriga, et saada 0,2 M etanoolamiini. Kasutades 5M HCl kohandati pH 10,6 juurde. 1L 0,9% soolalahuse tegemiseks läheb vaja 9g naatriumkloriid ja 1L dH<sub>2</sub>O.

PGS ettevalmistus. 10ml 80% PGS lahust pandi 50ml falkonisse ja pesti 2 korda soolalahusega. Peale teist pesu, pesti 1 kord TBT/etanoolamiini puhvriga. Peale TBT/etanoolamiiniga pesu, täideti tuub 50ml TBT/etanoolamiini puhvriga. Tuub asetati segajasse ja pandi külmikusse inkubeerima +4C juurde üle öö, mitte kauem kui 16h. Peale inkubatsiooni, eemaldati tuub



hübriidisaatorist, tsentrifuugiti ja kallati ära supernatant. Pesti 1 kord TB puhvriga (ilma tweenita). Pesti 3 korda steriilse soolalahusega. Lõpuks valmistati 50% suspensioon koos steriilse soolalahusega, mis sisaldas 20% EtOH.

## 2.3 Tulemused

Magistritöö valimi moodustas 303 uuritavat, kelle hulgas kontrollide oli 204 (67,33%) ja haigeid 99 (32,67%). Kontrollide seas oli mehi 67 (32,84%) ja naisi 137 (67,16%). Haigete seas oli mehi 56 (56,57%) ja naisi 43 (43,43%). Haigete keskmine vanus oli 20 aastat (noorim 2-aastane ja vanim 72-aastane). Kontrollidel keskmine vanus oli 29 aastat (noorim 1-aastane ja vanim 81-aastane). Haigete vanuse rühmade jaotus on välja toodud tabelis 2 ja kontrollide tabelis 3.

Tabel 2. Haigete vanuserühmade ja soo jaotus.

<b>Vanus</b>	<b>Haiged</b>	<b>Naised</b>	<b>Mehed</b>
<b>0-15</b>	62 (62,6 %)	30	32
<b>16-30</b>	15 (15,15 %)	5	10
<b>31-45</b>	13 (13,13 %)	3	10
<b>46-60</b>	5 (5,05 %)	3	2
<b>61-75</b>	4 (4,04 %)	2	2
<b>Kokku</b>	99 (100%)	43	56

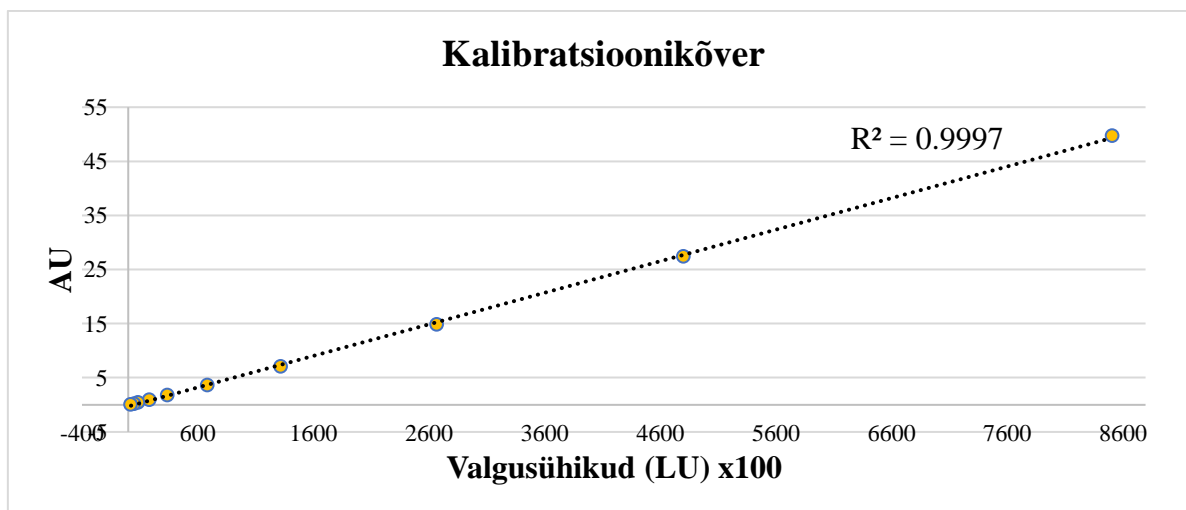
Tabel 3. Kontrollide vanuserühma ja soo jaotus.

<b>Vanus</b>	<b>Kontrollid</b>	<b>Naised</b>	<b>Mehed</b>
<b>0-15</b>	33 (16,18%)	15	18
<b>16-30</b>	101 (49,51 %)	71	30
<b>31-45</b>	33 (16,18%)	23	10
<b>46-60</b>	31 (15,19%)	24	7
<b>61-75</b>	4 (1,96%)	3	1
<b>76-90</b>	2 (0,98%)	1	1
<b>Kokku</b>	204 (100%)	137	67

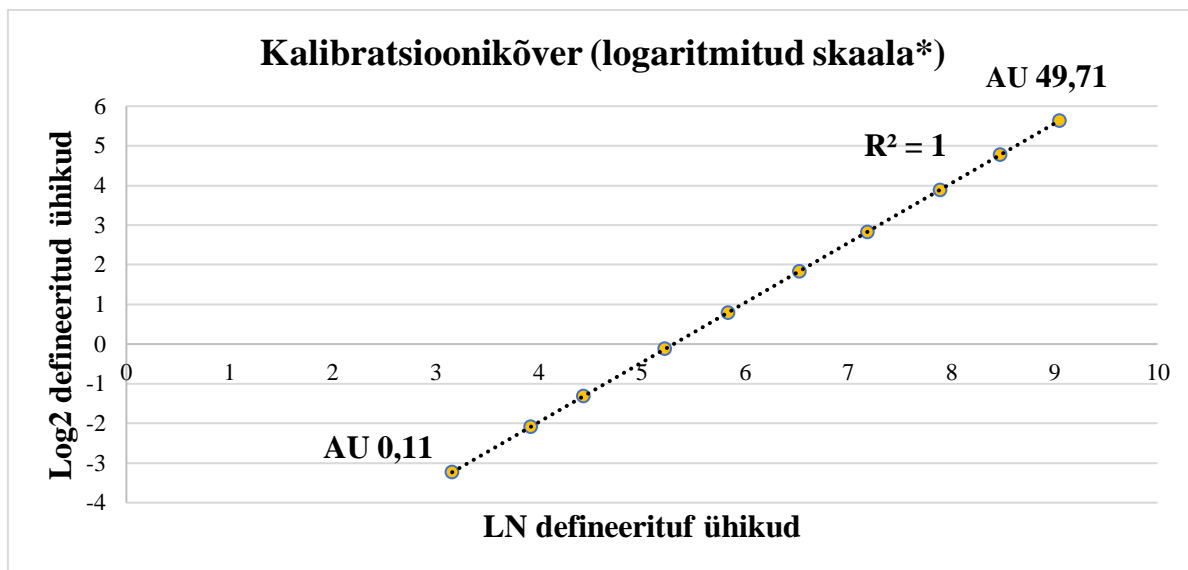
## Kalibraatorite valmistamine ja kalibratsioonikõvera konstrueerimine

Algsete kalibraatorite puhul kasutati hiire monokloonset antikeha inimese insuliini vastu, HuI-018. Lahjendused (IAA-negatiivsete inimeste vereseerum'i pool) 1:3200 ja sealt edasi 2x lahjenevalt, kokku 10 lahjendust. Seda antikeha selle patendi omanik enam ei tooda, seetõttu pidi hakkama teisi lahendusi otsima.

Standardite arendamiseks kasutasime kõrges tiitris IAA sisaldavaid inimseerumeid. Need inimseerumid on saadud Soomest, Mikael Knip'i laborist. Taina Härkönen'i käest; TRIGR/EDIA/DIABIMMUNE Core Laboratory, Children's Hospital, University of Helsinki. Segasime kolm sellist seerumit kokku. Lisaks segasime kokku IAA-LIPS analüüsis väga madalaid väärtusi näidanud inimeste seerumid, nn NHS-pool (normal human sera). HuI-018 baseeruva standardite reaga kõige enam kattuva kalibratsioonigraafiku andis algne lahjendus 1:3,5 (1 osa IAA-positiivsete seerumite segu ja 2,5 osa NHS). Analoogselt originaalse analüüsimeetodi kalibratsioonistandarditele tegime kahekordselt lahjenevate standardite rea (1/3,5; 1/7; 1/14; 1/28; 1/56; 1/112; 1/224; 1/448; 1/896; 1/1792). Analüüsimeetodis luminomeetriga mõõdetud valgusühikud (LU) teisendasime tuletatud ühikuteks (AU). Tabeli koostamisel kasutasime AU väärtuseid ja ka logaritmiliselt defineeritud ühikuid, kasutatud on algoritme Excelis (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) (joonis 3,4). Kalibratsioonikõvera graafik näitas  $R^2$  väärtuseks 0,99, mis näitab, et standardite lahjenduste reaga saadud mõõdetav väärtus kahaneb lineaarselt.



Joonis 3. Järjestikuste kahekordsete lahjenduste standardkõver. Y-teljel on valgusühikud teisendatud tuletatud ühikuteks (AU) ja x-teljel on luminomeetrist saadud toorinfo valgusühikutes (LU).



Joonis 4. Järjestikuste kahekordsete lahjenduste logaritmitud standardkõver. Y-teljel log2 AU ja x-teljel LN LU. \* Logaritmitud skaalat kasutatakse juhul kui saadud arvud on liiga suured või mõni väärtus erineb tunduvalt teistest tulemustest.

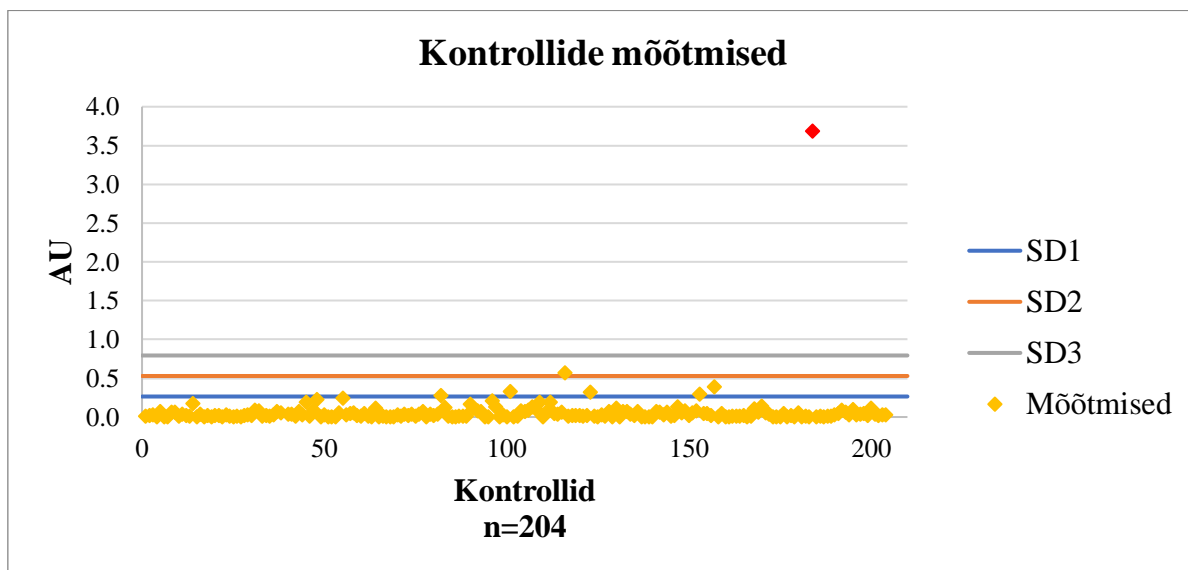
### Standardhälvete leidmine

Standardhälvete leidmisel võtsin aluseks kontrollide tulemused. Kasutasin Exceli (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) funktsiooni =STDEV.P. +SD2 ja +SD3 leidsin korrutades saadud SD väärtuse läbi vastavalt soovitud SD tulemusele (tabel 4).

Tabel 4. Standardhälve +1, +2 ja +3.

Standardhälve	
+ SD 1	0,26
+ SD 2	0,53
+ SD 3	0,79

Kandsin joonisele standardhälvete väärtused ja ka kontrollide tulemused (joonis 5).

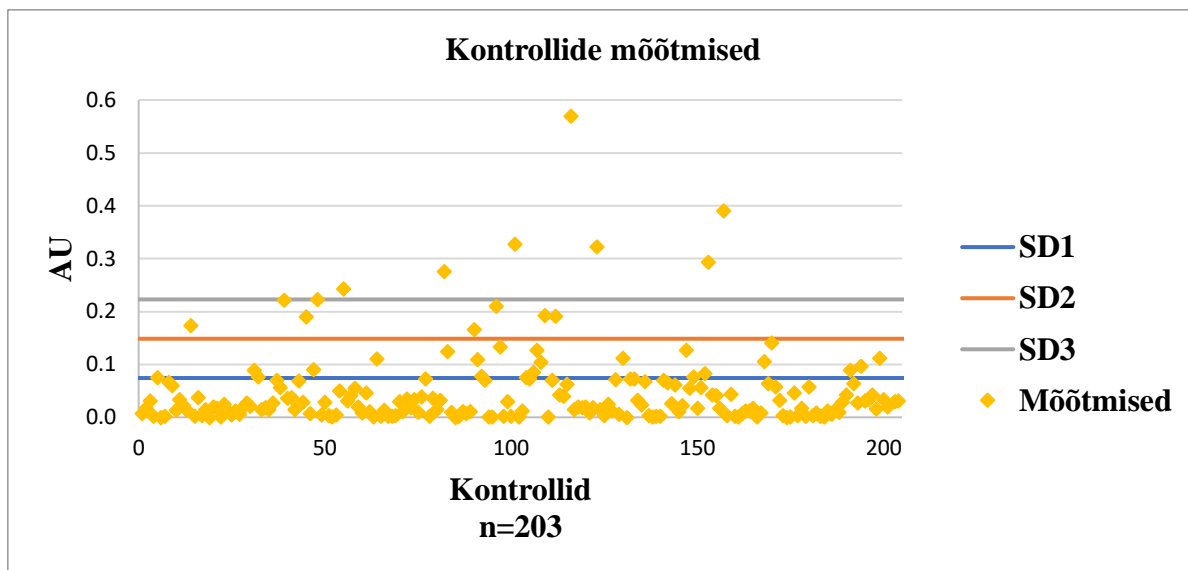


Joonis 5. Kontrollide mõõtmised. Y-teljel on tuletatud ühikud (AU) ja x-teljel kontrollide arv.

Enamus kontrollide analüüsitulemustest vastasid ootustele. 204 kontrollist, ühe tulemus oli tunduvalt kõrgem kui teistel. See ei ole piiripealne tulemus. Viitab IAA olemasolule ja sai kontrollide üldjaotusest eemaldatud. Antud kontroll tuleks uuesti analüüsida. Isik oli 35-aastane naine ja tal ei olnud proovi andmise hetkel diagnoositud T1D ega esinenud vastavaid sümptomeid. Teised AAK - GADA, IA-2A, ZnT8A olid tal negatiivsed. Eemaldas kõrge väärtuse ja leidsin uued standardhälbed ülejäänud kontrollidele (Tabel 5). Kandsin ülejäänud kontrollid joonisele (joonis 6).

Tabel 5. Standardhälve +1, +2, +3.

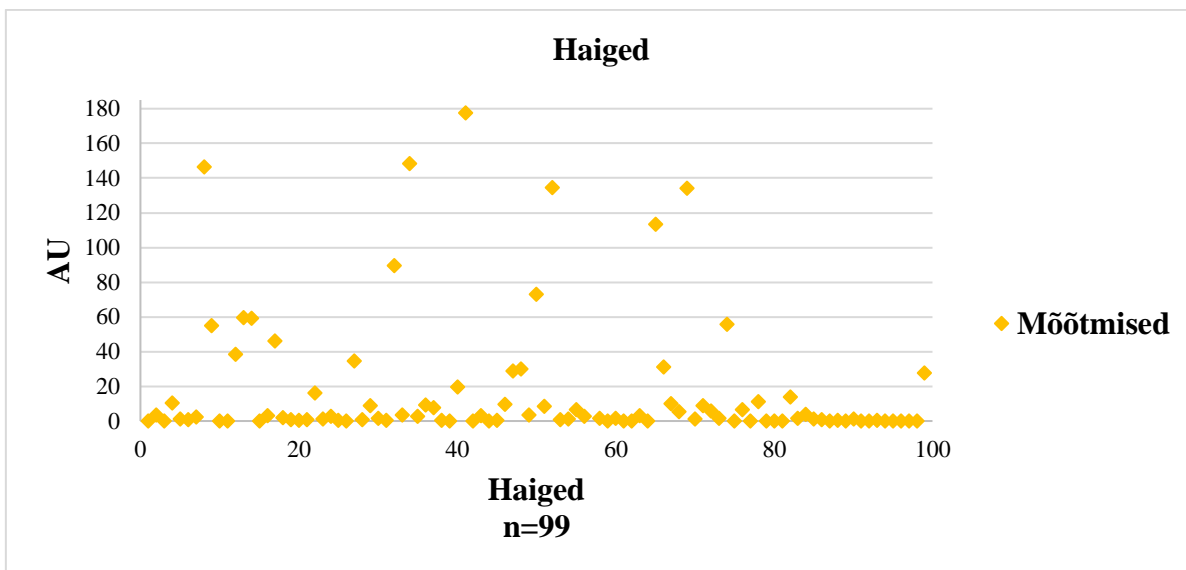
Standardhälve	
+ SD 1	0,07
+ SD 2	0,14
+ SD 3	0,22



Joonis 6. Kontrollide mõõtmised. Y-teljel on tuletatud ühikud (AU) ja x-teljel kontrollide arv.

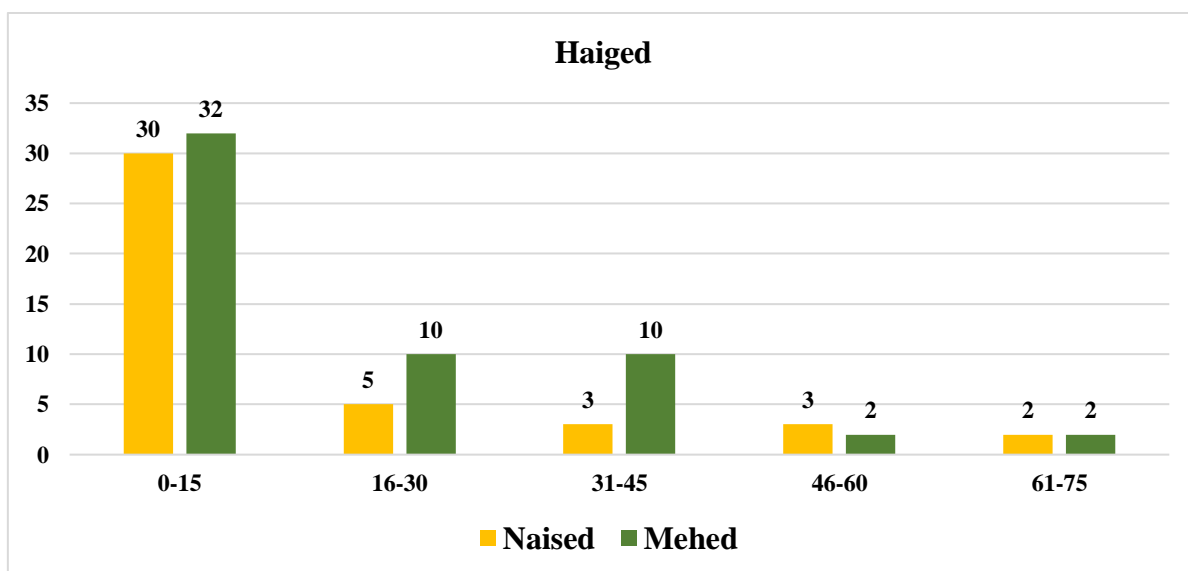
Joonisel on näha, et kõik väärtused ei mahu  $+SD3$  hulka, seega oleks vaja suuremat valimit, et saaks leida paremaid standardhälbe väärtuseid. Kirjanduses on välja toodud, et erinevate meetoditega varieeruvad SD väärtused  $+SD2$  kuni  $+SD6$  vahel normaalse populatsiooni seas (Palmer, 1987).

Lisaks kandsin haigete kontrollgrupi joonisele (joonis 7). LIPS analüüsil ilmnis, et kõrges kontsentratsioonis IAA ehk AU väärtusega üle 1, esines 59 (59,6%) isikul. Väga kõrges kontsentratsioonis IAAd, mis ületas kalibratsioonikõvera kõrgema väärtuse, oli 12 (12,12%) isikut ja nad kõik jäid vanuserühma 0-15 aastat. Madalam kui 1 AU väärtusega oli 40 (40,4%) isikut. Selle valemiga ei saa hetkel täpset läviväärtust paika panna, on raske öelda, millist AU väärtust võime lugeda diabeedi eelseks faasiks. All pool leiame läviväärtuse ROC-AUC kõvera kaudu.



Joonis 7. Haigete mõõtmised. Y-teljel on tuletatud ühikud (AU) ja x-teljel haigete arv.

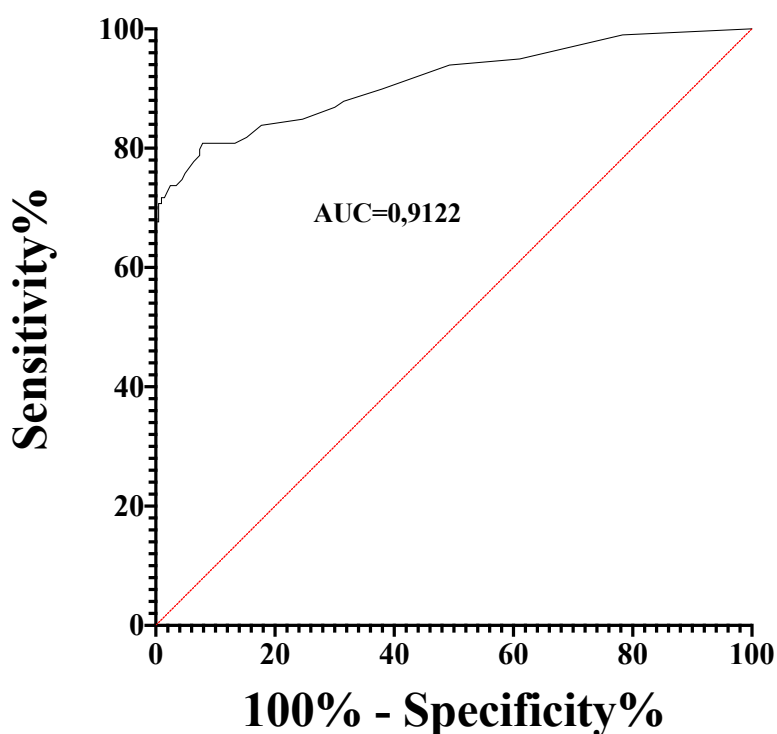
Haigete patsientide puhul madalad IAA väärtused võivad viidata sellele, et  $\beta$ -rakud on hävinenud ja selle vastased autoantikehad puuduvad. Nende puhul esinevad teised AAK. IAA esineb rohkem T1D uute juhtumite puhul. Vanusegruppide ja soo vaheline seos on väljatoodud joonisel 8.



Joonis 8. Haigete jaotus vastavalt vanusele ja soole. Y-teljel inimeste arv, X-teljel vanusegrupid.

Meetodi usaldusväärsuse kinnitamiseks koostas ROC-kõvera ja leidsin AUC ala (joonis 9). Selleks kasutasin programmi GraphPad Prism8.

## ROC kõver



Joonis 9. ROC kõver.

Sellel joonisel leitud AUC (kõvera alune ala) on 0,9122. Kirjanduse alusel on AUC väärtus 0,9, mis näitab antud meetodi väga head usaldavust. 95% CI usaldusvahemik on 0,8726-0,9518. Kontrollide ja haigete erinevused olid statistiliselt olulised ( $p < 0,0001$ ). Kirjanduse alusel leidsin, et kui analüüsi kasutatakse skriinimiseks või diagnoosimisvõimaluse välistamiseks, võib valida suurema tundlikkusega (ingl *sensitivity*) piirväärtuse/läviväärtuse ja kui analüüsi kasutatakse haiguse kinnitamiseks, on vajalik suurem spetsiifilisus (ingl *specificity*) (MedCalc). Tundlikkus (ingl *sensitivity*) näitab seda osa inimesi, kelle puhul on teada, et nad on kindlalt positiivsed ja spetsiifilisus (ingl *specificity*) näitab seda osa, kelle puhul on kindlalt teada, et nad on negatiivsed antud haigused või otsitava tulemuse osas. AUC ei saa olla otsene



mõõtevahend, kas antud väärtused annavad kliinilist kasu, peamine on see mis tulemused on kliinilises keskkonnas (Berrar ja Flach, 2012). Mina soovisin mõõtmiste puhul IAA olemasolu kinnitada, seega valisin suurema spetsiifilisuse. Antud arvutused ja numbrid leidis Graphpad Prism8 programm, kust leidsin vastava kriteeriumi kõrgema spetsiifilisuse korral. ROC-AUC kõvera järgi on selle programmi antud läviväärtus 0,55. Üle 0,55 tulemused viitavad IAA olemasolule ja alla 0,55 tulemused on negatiivse väärtusega.

Kontrollide tulemusega võrreldes jäid 203st kontrollist 202 alla 0,55 ja üks proovi mille tulemuseks on 0,57 üle selle. Seda proovi peaks uuesti analüüsima ja vaatama, kas jääb alla või üle 0,55.

Haigete puhul esines alla 0,55 tulemusi 32 (32,32%) ja üle 0,55 tulemusi 67 (67,68%). Eelnevalt mainitud, siis haigete puhul ei pruugi esineda enam IAA, kui pankrease kahjustus on kaugemale arenenud.

See meetod immunoloogia osakonnas arendatud kalibraatorite ja läviväärtusega osales T1D seoseliste autoantikehade standardiseerimise rahvusvahelises programmis IASP 2020 (Islet Autoantibody Standardization Program), kus analüüsiti kodeeritud 150 seerumiproovi, millest 50 pärinesid värskeltdiagnoositud T1D juhtumitelt (enne insuliinravi alustamist) ja 90 kontrollisikutelt (ning 10 seerumit olid kordustena). LIPS-IAA analüüs näitas IASP 2020 töötoas diagnostilist tundlikkust 36%, diagnostilist spetsiifilisust 100% ning AUC oli 0,847 (lisa 1).

## 2.4 Arutelu

Esimest tüüpi diabeet on suure kasvutrendiga haigus kogu maailmas. Tegemist on eluaegse haigusega, mille kontrolli all hoidmiseks tuleb võtta ravimeid, jälgida toitumist ja elustiili. Selle haiguse varajane leidmine ja haiguse patogeneesiprotsesside mõistmine võib aidata leevendada haigust või tagada paremat elukvaliteeti haiguse ajal. Paljud haigusjuhud diagnoositakse alles siis, kui haigus on juba tekkinud ja patsiendi seisund on raske või kriitiline. Kahjuks Eestis ei ole tehtud kogu populatsiooni põhiseid uuringuid diabeedi autoantikehade levimuse kohta. Väikelaste T1D tekke soodumust saaks analüüsida juba väga varases eas.

Käesoleva töö eesmärgiks oli kohandada insuliini autoantikehade analüüsimeetod immunoloogia osakonna laboris ja leida sellele analüüsimeetodile Eesti rahvastiku alusel optimaalne diagnostiline läviväärtus. Uuritavad oli EDU programmi seerumid. Haigete seas olid T1D põdevad inimesed. Analüüsiga leidsime haigete ja tervete inimeste veres leiduvaid inimeste IAA väärtused.

Kasutatud analüüsimeetodiga oleks võimalik kaardistada Eesti populatsiooni IAA. Need andmed annaksid meile parema ülevaate, kui paljudel inimestel esineb IAA ja kas lisanduvad teised saarekeste AAK.

Analüüsimeetodi kalibratsioonikõvera konstrueerimiseks vajalike kalibraatorite-standardite arendamiseks kasutati inimeste seerumeid, mis sisaldasid kõrges tiitris insuliini autoantikehi. Lisaks segati kokku inimeste seerumid, mis olid IAA-LIPS analüüsis näidanud väga madalaid väärtusi, nn NHS-pool (Normal human sera pool). Originaalse, inimese insuliini vastasel monokloonsel antikehal HuI-018 baseeruva standardite reaga kõige enam kattuva kalibratsioonigraafiku andis algne lahjendus 1:3,5 (1 osa IAA-positiivsete seerumite segu ja 2,5 osa NHS). Analoogselt originaalse analüüsimeetodi kalibratsioonistandarditele tegime kahekordselt lahjenevate standardite rea (1/3,5; 1/7; 1/14; 1/28; 1/56; 1/112; 1/224; 1/448; 1/896; 1/1792). Analüüsimeetodis luminomeetriga mõõdetud valgusühikud (LU) teisendasime tuletatud ühikuteks (AU). Kalibratsioonikõvera graafik näitas  $R_2$  väärtuseks 0,99, mis tõestab, et standardite lahjenduste reaga saadud mõõdetav väärtus kahaneb lineaarselt.

LIPS-IAA diagnostilise läviväärtuse leidmisel mediaani ja standardhälbe arvutamisel võeti aluseks kontrollrühma seerumite analüüsil saadud AU tulemused. Nende hulgast elimineeriti üks selgelt positiivne (3,68 AU) tulemus, mille järgselt normaaljaotuvusega väärtuste puhul

kasutasin Exceli tabelarvutuse valemit standardhälbe leidmisel. Minu leitud 3SD+ ei olnud piisav, et leida parimat piiri, mis kontsentratsioonist alates võib lugeda IAA hulka positiivseks, et võib kahtlustada diabeedi eelset faasi või T1D.

Lisaks võtsin kasutusele GraphPadi ROC-AUC arvutused, et leida sobivamat ja laiemat piirväärtust/läviväärtus analüüsi tulemustele. Vastavalt neile arvutustele sain läviväärtuseks 0,55, mis sobitub paremini kontrollidega. Ainult üks kontroll 203st oli AU väärtusega 0,57. Sellele üle läviväärtuse, proovi analüüsi tuleks korrata, et näha kas ta jääb alla või üle 0,55 aga pigem on see piiripealne tulemus.

Eksperimentide tulemusel selgus, et enamus kontrollrühma seerumite IAA väärtustest olid negatiivsed. 204 kontrollis ühe isiku proovi analüüsi väärtus oli teistest tunduvalt kõrgem ja kindlalt IAA positiivne. See isik on 35a naine, tal ei esine GAD65A, IA-2A, ZnT8A, samuti koetransglutaminaasi (tsöliaaka marker); HLA haplotüübid T1D suhtes nõrgalt ja tugevalt kaitsvate alleelidega T1D suhtes ning summaarselt HLA tugevalt protektiivse toimega T1D tekkimise suhtes. Puuduvad kliinilised andmed ei võimalda spekuloida selle üle, kas IAA positiivsus võib olla tekkinud varasema eksogeense insuliini manustamise (mingisugustel meditsiinilistel näidustustel) tagajärjel.

Haigete puhul selgus, et suurel osal puudusid IAA-d. Seega tuleb lisaks IAA-le vaadata kliinilist pilti ning teha analüüsid teiste AAK suhtes, peamiselt GAD65 ja IA-2 AAK. IAAd kaovad pankrease kahjustuse süvenemisel, seetõttu ei pruugi kaugele ja kaua kestnud T1D puhul esineda IAAd. Töös leitud kõrged IAA kontsentratsioonid vastasid 0-15 aastaste vanusegrupile, mis vastab kirjandusele, et IAAd tekivad pigem väikelastel ja noortel (Herawati, et al., 2017).

Antigeeniga konkureeriva „külma“ insuliini (ingl „cold“ *insulin*, märgistamata insuliin) lisamine paralleelkatsetes näitas milliste proovide puhul toimub antigeeni mitte-spetsiifiline sidumine. Suurem osa spetsiifilisi antikehi seondus lisatud „külma“ insuliiniga ja väiksem osa proovis olevatest autoantikehadest seondusid antigeeniga, mis summaarselt tekitas inhibeeriva toime. Kontrollidel, kellel puudusid IAA, olid IAA kontsentratsioonid madalad ja nende puhul „külma“ insuliini lisades ei tekkinud niivõrd suurt inhibeerivat toimet.

On soovitatav edaspidi meetodi etappe automatiseerida, see vähendab juhuslike vigade tõenäosust ja võimaldab rohkem proove analüüsida. Enamus vigadest tulid agarose partiklite ülekandmisel ühelt MTP teisele MTP-le. Kui selle etapi saaks automatiseerida või kuidagi

ümber muuta, siis ei läheks agarooosi-partikleid kaotsi ja paralleelkatsed oleksid ühtlasemad. Antud meetodi kontrolliks tuleks haigete ja kontrollide valimit suurendada. See võimaldaks paika panna kindlamad mediaanväärtused koos standardhälvetega ja läviväärtused. Soovitatav on automatiseerida ka pesuprotsessid. Rohkem mikrotiiter plaate korraga analüüsi kaasates, saab selle vaheetapi kiiremini ja sujuvamalt teha. Kui eelnimetatud etapid mingil määral automatiseerida, siis saab ehk tulevikus seda meetodit kasutada ka meditsiinilaborites Eestis.

Võrreldes RBA-ga on LIPS meetodil palju eeliseid. Esmalt radioaktiivse märgistuse vältimine, mis on RBA tundlikkuse ja keerukuse peamine allikas. Lisaks pakub LIPS lühemat analüüsi aega ja vajab väiksemat uuritava materjali ehk seerumi kogust (2µl, võrreldes RBA, mis vajab oma tööks 5-30µl proovi kohta). LIPSi saab kasutada töötamiseks arhiiviproovidega, mida tavaliselt võib olla väga vähe või selle kasutamine on piiratud. Saab kasutada ka kapillaariverd uuritavaks prooviks (Liberati, et al., 2017).

Kasutatud LIPSi meetod on usaldusväärne ja sobiv meetod IAA detekteerimiseks. Antud analüüsi meetod võimaldab oma väikese materjali kulu tõttu teha proove ka kapillaarverest, mida saab juba alla aastaste laste puhul kasutada. Analüüsimeetod ise on selge ja arusaadav. Etapid on konkreetsed ja analüüs ise ei võta kaua aega. Etappe automatiseerides saaks analüüsi aega kiirendada ja analüüsitavate proovide arvu suurendada.

## Kokkuvõte

Käesoleva magistritööga kohandati insuliini autoantikehade määramiseks LIPS meetod, leiti antud meetodile kalibraatorid ja prooviti leida sobivad läviväärtused Eesti populatsioonile. Töö tulemuste põhjal võib järeldada, et antud meetod sobib IAA määramiseks ja selle kasutamine on sobiv antud laboritingimustes.

Leitud kalibraatorid sobisid lahjendusrea moodustamiseks. Kalibratsioonikõvera joonisele kandmisel näitas  $R_2$  väärtuseks 0,99, mis tõestab et standardite lahjenduste reaga saadud mõõdetav väärtus kahaneb lineaarselt. ROC kõveral leitud kõvera alune ala väärtuseks on 0,9, mis näitab antud meetodi väga head usaldusväärsust. Sai välja arvutada standardhälbed ( $SD_1 = 0,07$ ,  $SD_2 = 0,14$ ,  $SD_3 = 0,22$ ). Lisaks võeti kasutusele GraphPadi ROC-AUC arvutused ja selle kohaselt leiti optimaalne läviväärtus milleks on 0,55. AU optimaalsemate läviväärtuste leidmiseks oleks tarvis suuremat kontrollide valimit. Kontrollide seas leidis üks kindlalt positiivse IAA väärtusega proov. Hetkel, kui antud isik andis vereproovi, ei esinenud tal T1D-le vastavaid sümptomeid. Tal olid teised T1D AAK negatiivsed.

Lisaks kategoriseeriti haigete valim vanuse ja soo järgi. Kõige rohkem ja kõrgemad IAA väärtused olid 0-15-aastaste vanuserühmas. See, et kõige sagedamini esineb IAA-id väikelastel ja noortel, on kooskõlas ka teaduskirjanduse andmetega.

Meetodi edasiarendamisel tuleks haigete ja kontrollide arvu suurendada, et veelgi parandada analüüsi toimimist ja kinnitada usaldusväärsust. Automatiseerides analüüsi selle erinevates etappides annaks see suurema võimekuse analüüsida rohkem proove ja elimineerida juhuslike vigu, mis võivad tekkida laborandi erineva „käekirja“ tõttu. Kui olulised etapid saab automatiseerida, siis on tulevikus võimalik selle kasutamist juurutada ka meditsiinilaborites Eestis.

## Summary

The incidence of type 1 diabetes (T1D) has increased worldwide over recent decades. *Diabetes mellitus* is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia due to insulin secretion, insulin resistance, or defects in both. Diabetes is differentiated into three major types - type I diabetes (T1D), type II diabetes (T2D) and gestational diabetes (GDM). One of the major risk factors for developing diabetes is obesity, an unbalanced diet and lack of exercise. 90-95% of all cases of diabetes are type II diabetes.

The exact causes of T1D are unknown. Significant associations have been found with human leukocyte antigens (HLA), autoantibodies (AAB), enteroviruses and diet.

The five main autoantibodies associated with T1D formation are anti-islet cell antibodies (ICA), anti-insulin autoantibody (IAA), anti-glutamate decarboxylase 65kDa isoform autoantibody (GAD65A), protein-tyrosine phosphatase-associated IA-2 autoantibody (IA-2 autoantibody) autoantibody against zinc transporter 8 (ZnT8A).

Insulin autoantibodies (IAA) were analyzed in this work. IAAs are the first autoantibodies to be found in patients in diabetes prevention studies, but they disappear as the pancreatic damage increases. Therefore, they may no longer be present in the case of long-term T1D, in which case other AABs must be determined.

The LIPS method for the analysis of insulin autoantibodies is based on luciferase-labeled antigens. Nanoluc is a luciferase isolated from deep-sea shrimp. It is a small protein and is more stable and brighter than other luciferases. Nanoluc luciferase is an enzyme that catalyses the substrate furimazine, which together produce light that can be measured with a luminometer.

In this master's thesis the LIPS method was adapted for the determination of insulin autoantibodies, calibrators for this method and suitable threshold values for Estonian population were found. Based on the results of the work, it can be concluded that this method is suitable for the determination of IAA and its use is convenient in the given laboratory conditions.

The calibrators found were suitable for forming a dilution series. When plotting the calibration curve, R<sup>2</sup> showed a value of 0.99, which proves that the measured value obtained decreases linearly with the series of standard dilutions. The area under the curve found on the ROC curve is 0.9, which indicates a very good reliability of this method. Standard deviations were

calculated ( $SD1 = 0.07$ ,  $SD2 = 0.14$ ,  $SD3 = 0.22$ ). In addition GraphPad ROC-AUC calculations was taken into use and an optimal threshold of  $>0.55$  was found. A larger sample of controls would be needed to find more optimal AU thresholds. Among the controls was one sample with a definite positive IAA value. At the time the subject gave the blood sample, no symptoms consistent with T1D were present. In addition, the subject's other T1D autoantibodies were negative.

As the method is further developed, the number of patients and controls should be increased to further improve the performance of the analysis and confirm its reliability. Automating the analysis at its various stages would provide a possibility to analyze more samples and eliminate random errors. If the important stages can be automated, then in the future it will be possible to introduce its use in medical laboratories in Estonia.

## Kasutatud kirjandus

**Akerblom, H. K., Vaarala, O., Hyöty, H., Ilonen, J. ja Knip, M. (2002).** Environmental Factors in the Etiology of Type 1 Diabetes. *American Journal of Medical Genetics*. 115:18-29.

**Ambos, A. Raie, E., Kiudma T., Reppo, I., Rätsep, A., Tammiksaar, K., Toomsoo, T. ja Volke, V. (2016).** 2. Tüüpi diabeedi Eesti ravijuhend 2016. *Eesti Arst*. 96(7): 465-473.

**American Diabetes Association (2014).** Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 37: 81-90.

**American Diabetes Association (2020).** Classification and Diagnosis of Diabetes: Standarts of Medical Care in Diabetes – 2020. *Diabetes Care*. 43:14-31.

**Anik, A., Catli, G., Abaci, A. ja Böber, E. (2015).** Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 28(3-4):251-63.

**Berrar, D. ja Flach, P. (2012).** Caveats and pitfalls of ROC analysis in clinical microarray research (and how to avoid them). *Briefings in Bioinformatics*. 13(1): 83-97.

**Bluestone, J. A., Herold, K. ja Eisenbarth, G. (2010).** Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 464(7293):1293-1300.

**Burbelo, P. D., Lebovitz, E. E. ja Notkins A. L. (2015).** Luciferase immunoprecipitation systems for measuring antibodies in autoimmune and infectious diseases. 165(2)

**Buzzetti, R., Prudente, S., Copetti, M., Dauriz, M., Zampetti, S., Garofolo, M., Penno, G. ja Trischitta, V. (2016).** Clinical worthlessness of genetic prediction of common forms of diabetes mellitus and related chronic complications. *A position statement of the Italian Society Diabetology*. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 27: 99-114.

**Chimienti, F., Favier, A. ja Seve, M. (2005).** ZnT-8, a pancreatic beta-cell-specific zinc transporter. *BioMetals*. 18: 313-317.

**D'Angeli, M. A., Merzon, E., Valbuena, L. F., Tirschwell, D., Paris, C. A. ja Mueller, B. A. (2010).** Environmental Factors Associated With Childhood-Onset Type 1 Diabetes Mellitus. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 164(8): 732-738.



- England, C. G., Ehlerding, E.B. ja Cai, W. (2016).** NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. *Bioconjugate Chemistry*. 27:1175-1187.
- Faideau, B., Larger, E., Lepault, F., Claude, J. ja Boitard, C. (2005).** Role of  $\beta$ -Cells in Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Diabetes*. 54(2): 87-96.
- Fida, S. ja Rowley, M. J. (1998).** Radioimmunoprecipitation Assay for Antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase and Other Autoantigens in Microplates. *TopCount Topic, TCA-032*.
- Forouhi, N. G. ja Wareham, N. J. (2019).** Epidemiology of diabetes. *Medicine*. 47(1): 22-27.
- Hamzehlou, S., Albert, P. R. ja Farajollahi, M. M. (2015).** Requirement of a Blocking Step in Affinity Purification of Polyclonal Antibodies. *Int J Mol Med*. 4(3): 196-198.
- Herawati, E., Susanto, A. ja Sihombing, C. N. (2017).** Autoantibodies in Diabetes Mellitus. *Mol Cell Biomed Sci*. 1(2): 58-64.
- Hu, Y.F., Zhang, H.L., Cai, T., Harashima, S. ja Notkins, A. L. (2005).** The IA-2 interactome. *Diabetologia*. 48(12) : 2576-2581.
- Huang, G., Xiang, Y., Pan, L., Li, X., Luo, S. ja Zhou, Z. (2013).** Zinc transporter 8 autoantibody (ZnT8A) could help differentiate latent autoimmune diabetes in adults (LADA) from phenotypic type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*. 29(5): 363-368.
- Kulmala, P., Rahko, J., Savola, K., Vähäsalo, P., Veijola, R., Sjöroos, M., Reunanen, A., Ilonen, J. ja Knip, M. (2000).** Stability of Autoantibodies and Their Relation to Genetic and Metabolic Markers of Type I Diabetes in Initially Unaffected Schoolchildren. *Diabetologia*. 43(4): 457-64.
- Lampasona, V. ja Liberati, D. (2016).** Islet Autoantibodies. *Current Diabetes Reports*. 53.
- Liberati, D., Wyatt, R. C., Brigatti, C., Marzinotto, I., Ferrari, M., Bazzigaluppi, E., Bosi, E., Gillard, B. T., Gillespie, K. M., Gorus, F., Weets, I., Balti, E., Piemonti, L., Achenbach, P., Williams, A. J. K. ja Lampasona, V. (2018). A novel LIPS assay for insulin autoantibodies. *Acta Diabetologica*. 55: 263-270.
- Loh, J. M. S. ja Proft, T. (2013).** Comparison of firefly luciferase and NanoLuc luciferase for biophotonic labeling of group A Streptococcus. *Biotechnology Letters*. 36: 829-834.

- Lubi, M. (2006).** Diabeedi klassifikatsioon, diagnoosimine ja kompensatsiooni kriteeriumid. Eesti Arst. 85(6):362-365.
- Lutsar, K., Heilman, K., Simre, K. ja Kiivet, R-A. (2013).** Insuliinipumpade kasutamine laste 1. tüüpi diabeedi ravis. Tartu Ülikooli tervishoiu instituut.
- Naik, R. G., Brooks-Worell, B. M. Ja Palmer, J. P. (2009).** Latent Autoimmune Diabetes in Adults. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. volume 94, issue 12, 4635-4644.
- Noble, J. A. ja Erlich, H. A. (2012).** Genetics of Type 1 Diabetes. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.
- Notkins, A. L. ja Lernmark, A. (2001).** Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. The Journal of Clinical Investigation. 108(9): 1247-1252.
- Nyaga, D.M., Vickers, M. H., Jefferies, C., Perry, J. K. ja O'Sullivan, J. M. (2018).** The genetic architecture of type 1 diabetes mellitus. Molecular and Cellular Endocrinology. 477:70-80.
- Ounissi-Benkhalha, H. ja Polychronakos, C. (2008).** The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. Trends Mol. Med. 14: 268-275.
- Paat-Ahi, G. ja Nurm, Ü-K. (2017).** Rahvastiku Tervise Arengukava 2009-2020 vahehindamine. Diabeedi valdkonna aruanne. Tallinn: Poliitikauuringute Keskus Praxis.
- Palmer, J. P. (1987).** Insulin autoantibodies: Their role in the pathogenesis of IDDM. Diabetes/Metabolism Reviews. 3(4): 1005-1015.
- Rewers, M. ja Ludvigsson, J. (2016).** Environmental risk factors for type 1 diabetes. The Lancet. 387: 2340-2348.
- Zhang, L. ja Eisenbarth, G. S. (2011).** Prediction and prevention of Type 1 diabetes mellitus. Journal of Diabetes. 3:48-57.
- Uibo, R., Kisand, K., Peterson, P. ja Reimand, K. 2015.** Immunoloogia. Õpik kõrgkoolile, p. 27-31.
- Williams, A. J. K., Norcross, A. J., Chandler, K. A. ja Bingley, P. J. (2006).** Non-specific binding to protein A Sepharose and protein G Sepharose in insulin autoantibody assays may be

reduced by pre-treatment with glycine or ethanolamine. *Journal of Immunological Methods*. 314: 170-173.

**Yoon, J.-W. ja Jun, H.-S. (2005).** Autoimmune Destruction of Pancreatic b Cells. *American Journal of Therapeutics*.12:580–591

**Yoon, J.-W. ja Jun, H.-S. (2006).** Cellular and Molecular Pathogenic Mechanisms of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences*.

## Kasutatud veebileheküljed

**Heinaru, A.** Geneetika sõnastik. (<http://geneetika.ee/lexicon/>) [19.03.2020]

**Eesti Diabeediliit.** (<http://www.diabetes.ee/mis-on-diabeet>) [16.04.2020]

**Lehtme, R.** C-peptiid (S,P-C-pept).

(<https://www.kliinikum.ee/yhendlabor/pildid/kasiraamat/BC/c-peptiid.pdf>) [23.05.2020]

**Maailma tervise organisatsioon** (World Health Organisation) (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>) [30.01.2020]

**MedCalc.** ROC curve analysis.

(<https://www.medcalc.org/manual/roc-curves.php>) [31.05.2020]

**Metsküla, K.** Autoimmuunse diabeedi uuringud.

([https://kliinikum.ee/yhendlabor/pildid/kasiraamat/A/Autoimmuunse\\_diabeedi\\_uuringud\\_08102019.pdf](https://kliinikum.ee/yhendlabor/pildid/kasiraamat/A/Autoimmuunse_diabeedi_uuringud_08102019.pdf)) [29.05.2020]

**Pittman, D. 2017.** Insulin, insulin antibodies and insulin autoantibodies.

(<https://www.mlo-online.com/diagnostics/assays/article/13009019/insulin-insulin-antibodies-and-insulin-autoantibodies>) [09.06.2020]

**Tervise Arengu Instituut.** Tervisestatistika ja terviseuuringute andmebaas. EH12: Esmahaigestumus 100 000 elaniku kohta soo ja vanuserühma järgi. ([http://pxweb.tai.ee/PXWeb2015/pxweb/et/02Haigestumus/02Haigestumus\\_\\_01Esmahaigestumus/EH12.px/table/tableViewLayout2/?rxid=63d10cb6-e809-466d-b68f-14ca60f96e6a](http://pxweb.tai.ee/PXWeb2015/pxweb/et/02Haigestumus/02Haigestumus__01Esmahaigestumus/EH12.px/table/tableViewLayout2/?rxid=63d10cb6-e809-466d-b68f-14ca60f96e6a)) [16.04.2020]

# Lisad



## Islet Autoantibody Standardization Program (IASP)

### Preliminary Performance Report

Date of report: 03/31/2020

Laboratory: 0507 University of Tartu, Inst. of Biomed. and Transl. Med., Dept. of Immunology

#### Performance Characteristics<sup>1</sup>

Antibo	Method/Description	% Sensitivity	% Specificity	AUC <sup>2</sup>	AUC <sub>p</sub> <sup>7</sup>	AS95 <sup>3</sup>	Accuracy <sup>4</sup>	T1D Reported <sup>5</sup>	Control Reported <sup>6</sup>
IAA	Luciferase Immunoprecipitation System(LIPS)-proinsulin	36.0	100.0	0.847	0.0496	54.0	77.14	50	90
ZnT8A	CRCW-ELISA (C-Terminal arginine & tryptophan)	78.0	98.9	0.892	0.0791	80.0	91.43	50	90

<sup>1</sup> Based on laboratory submitted findings.

<sup>2</sup> Total Area Under the Curve derived from Receiver operating characteristics (ROC) analysis.

<sup>3</sup> % Sensitivity at 95% specificity derived from Receiver operating characteristics (ROC) analysis.

<sup>4</sup> % Accuracy: (Number of New Onset identified as positive+Number of Controls identified as negative)/ (number of New Onset samples reported+number of Controls samples reported)

<sup>5</sup> Number of T1D sample results submitted by your laboratory (maximum number=50)

<sup>6</sup> Number of Control sample results submitted by your laboratory (maximum number=90)

<sup>7</sup> Partial (specificity >90%) Area Under the Curve derived from Receiver operating characteristics (ROC) analysis.

Lisa 1. Autoantikehade standardiseerimise rahvusvaheline programm IASP 2020 (Islet Autoantibody Standardization Program), kus analüüsiti kodeeritud 150 seerumiproovi, millest 50 pärinesid värskeltdiagnoositud T1D juhtumitelt (enne insuliinravi alustamist) ja 90 kontrollisikutelt (ning 10 seerumit olid kordustena). LIPS-IAA analüüs näitas IASP 2020 töötoas diagnostilist tundlikkust 36%, diagnostilist spetsiifilisust 100% ning AUC oli 0,847.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Keiu-Anett Hellaste,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Insuliini autoantikehade määramine lutsiferaas-immunopretsipitatsioon analüüsimeetodiga“, mille juhendaja on *PhD* Koit Reimand, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Keiu-Anett Hellaste

09.06.2020