TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

MOLEKULAARPATOLOOGIA UURIMISGRUPP

Tuuliki Pomerants

INTERLEUKIIN 1-ALFA VASTASED AUTOANTIKEHAD: ESINEMISSAGEDUS JA VÕIMALIK BIOLOOGILINE ROLL

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendajad

Liina Tserel PhD

Tõnis Org PhD

TARTU 2022

Infoleht

INTERLEUKIIN 1-ALFA VASTASED AUTOANTIKEHAD: ESINEMISSAGEDUS JA VÕIMALIK BIOLOOGILINE ROLL

Antud töös uuriti interleukiin 1 alfa (IL1-α) autoantikehade esinemist eri valimites ning nende neutraliseerimisvõimet. Uuringusse kaasati 849 plasmaproovi. Töös uuriti, kas esineb seos vanuse ja IL1-α autoantikehade sekreteerimise vahel. IL1-α autoantikehade tase määrati lutsiferaasil põhineval immuunsadestamise meetodiga (LIPS). Populatsiooni läbilõikes olid kõrge autoantikehade tasemega 7% uuritavatest, kuid proovidest, mis olid kogutud Tartu Ülikooli Kliinikumi Sise ja Nahahaiguste kliinikutest oli autoantikehade kõrge tase tuvastatav 14%, ja COVID-19 põdenute grupis olid kõrge tasemega 19% indiviididest. Vanuse seost sekreteerimisel ei leitud. Samuti uuriti kõrge IL1-α autoantikehade tasemega proovide neutraliseerivat aktiivsust ning leiti positiivne korrelatsioon autoantikehade koguse ja nende neutraliseerimisvõime vahel. Seost neutraliseerivate IL1-α autoantikehade ja COVID-19 põdemise raskuse vahelist seost ei suudetud tuvastada ning see teema vajab edasist uurimist.

Märksõnad: autoantikehad, IL1-α, COVID-19

CERCS: 500 immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

AUTOANTIBODIES AGAINST INTERLEUKIN 1-ALPHA: FREQUENCY AND POTENTIAL BIOLOGICAL ROLE

This work investigated the presence of interleukin 1-alpha (IL1-α) autoantibodies in different populations and their ability to neutralize the cytokine IL1-α. 849 plasma samples were used in this study. In this study the effects of age on IL1-α autoantibody secretion was examined. IL1-α autoantibody levels were determined by luciferase-based immunoprecipitation system (LIPS). In the normal population 7% of the subjects had high autoantibody levels. In samples that were collected from TÜK clinics high levels of autoantibodies were found in 14%. In the COVID-19 recovered high levels were found in 19% of individuals. No correlation between age and antibody levels was found. Samples with high levels of IL1-α autoantibodies were tested for IL1-α neutralizing activity. A positive correlation was seen between the amount of autoantibodies and their ability to neutralize IL1-α. No association between neutralizing IL1-α autoantibodies and the severity of COVID-19 disease found and the topic needs further research.

Keywords: Autoantibodies, IL1-α, COVID-19

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

Sisukord

Infoleht 2
Kasutatud lühendid 4
Sissejuhatus 6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE 7
1.1. Antikehad 7
1.1.2. Autoantikehad 8
1.2 Tsütokiinid 9
1.2.1. Interleukiin 1-alfa ja põletik 10
1.2.2. CXCL-8 11
1.3 IL1-α vastased autoantikehad 12
1.4. Autoantikehad SARS-CoV-2 viiruse korral 13
2. EKSPERIMENTAALOSA 14
2.1 Töö eesmärgid 14
2.2. Materjal ja metoodika 14
2.2.1 Valimi kirjeldus 14
2.2.2. Rakuliinid ja söötmed 15
2.2.3. LIPS (*Luciferase immunoprecipitation system*) 16
2.2.4. IL1-α autoantikehade neutraliseerimisvõime testimine 16
2.2.5. CXCL-8 mõõtmine ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) meetodiga 17
2.2.6. Andmeanalüüs 18
2.3. Tulemused 19
2.3.1. LIPS katse korratavus 19
2.3.2. IL1-α autoantikehade taseme määramine LIPS analüüsil 19
2.3.3. IL1-α autoantikehade taseme seos vanusega 21
2.3.4. Neutraliseerimiskatsete tulemuste analüüs 23
2.3.5. Kõrge IL1-α autoantikehade tase korreleerub neutraliseerimisvõimega 24
2.3.6. COVID-19 haigestunute autoantikehad 24
2.4 Arutelu 26
KOKKUVÕTE 30
SUMMARY 31
ALLIKAD 32
Kirjanduse loetelu 32
Kasutatud veebiallikad 39
Lihtlitsents 40

Kasutatud lühendid

BCR	B-raku retseptor (*B-cell receptor*)
CXCL-8	C-X-C motiiviga ligand 8 *(C-X-C motif ligand 8)*
CXCR1	C-X-C motiiviga kemokiini retseptor alfa *(C-X-C motif chemokine receptor alpha*)
CXCR2	C-X-C motiiviga kemokiini retseptor beeta (*C-X-C motif chemokine receptor beta*)
DARC	Duffy antigeeni retseptor (*Duffy antigen receptor*)
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
ELISA	immunosensüümmeetod (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
FBS	Veise loote seerum (*Fetal bovine serum*)
IFN	Interferoon (*Interferon*)
Ig	Immunoglobuliin (*Immunoglobulin*)
IL	Interleukiin (*Interleukin)*
IL1R1	Interleukiin 1 retseptor tüüp 1 (*Interleukin 1 receptor type 1*)
IL1-α	Interleukiin 1 alfa (*Interleukin-1 alpha*)
LIPS	Lutsiferaasil põhinev immuunsadestamine (*Luciferase immunoprecipitation system)*
LU	Luminestsentsi ühik (*Luminesence unit*)
NHDF	Normaalsed inimese naha fibroblastid (*Normal human dermal fibroblasts)*
PBS	Fosfaadiga puhverdatud soolalahus (*Phosphate buffered saline*)
RA	Reumatoidartriit (*Rheumatoid arthritis)*
SARS-CoV-2	Ägeda raskekujulise respiratoorse sündroomiga koroonaviirus 2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)
SLE	Süsteemne erütemaoosne luupus *(Systemic lupus erythematosus)*
SD	Standardhälve (*Standard deviation*)

TNF	Kasvaja nekroosi faktor (*Tumor necrosis factor*)

Sissejuhatus

Tsütokiinid on väikesed valgud, mille abil toimub rakkude suhtlus. Nende vahendatud signaalid mängivad olulist rolli rakutsüklis ja need on vajalikud immuunsüsteemi funktsioneerimiseks, sest nende abil algatatakse ja reguleeritakse kehas põletikku. Üheks esimeseks tsütokiiniks, mille sekretsiooni tõttu põletikureaktsioon alguse saab on interleukiin 1-alfa (IL1-α). Seondudes rakkude retseptoritega, käivitab see mitmete järgmiste põletikuliste tsütokiinide vabanemise. Nende koostoimel toimub immuunrakkude liikumine sinna, kust tsütokiinid pärinesid.

Põletikuvastus on vajalik, et keha saaks erinevate patogeenidega võidelda, samas tekitab selle liigsus ja pikale venimine kudedele kahjustusi. See on väga asjakohane ülemaailmse pandeemia põhjustanud SARS-CoV-2 viiruse kontekstis, kus mitmed patsiendid kannatavad nende enda immuunsüsteemi põhjustatud kopsukahjustuste käes. Samuti kannatavad selle all paljud autoimmuunhaigusi põdevad patsiendid.

Nendel patsientides on nähtud selliste antikehade tõusu, mis reageerivad keha enda molekulidega. Seda tüüpi antikehi nimetatakse autoantikehaks. Selles töös keskenduti IL1-α vastasele autoantikehale. Kui takistada selle tsütokiini seondumist oma retseptoriga, saab ära hoida põletiku teket. Autoimmuunhaiguste puhul on sellisel moel võimalik ära hoida raskekujulisemate sümptomite teket. Nakkushaiguste puhul võib see põhjustada hilinenud immuunvastust ja seeläbi mõjutada haiguse kulgu.

Käesoleva töö eesmärkideks on uurida kui palju IL1-α autoantikehi leidub erinevates valmites ja kas selle autoantikeha kogust mõjutab inimeste vanus. Lisaks uuritakse kas IL1-α autoantikehad on võimelised oma autoantigeeni neutraliseerima ning kuidas see võime erineb eri valimite hulgas.

Bakalaureusetöö valmis Meditsiiniteaduste valdkonnas, Bio- ja Siirdemeditsiini instituudis, Molekulaarpatoloogia uurimisgrupis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

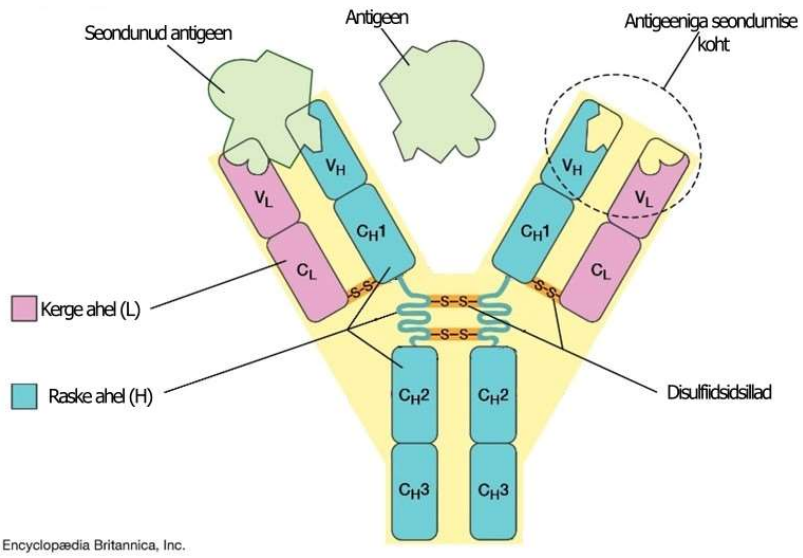
1.1. Antikehad

Immuunsüsteemi eesmärk on kaitsta keha haigustekitajate eest. Immuunsüsteemi kirjeldatakse tavaliselt kaheosalisena. Esimesena reageeriv kaasasündinud immuunsus ning hilisem, kuid oma vastuses spetsiifilisem omandatud immuunsus.

Omandatud immuunsüsteemi oluliseks osaks on B-lümfotsüütide sekreteeritavad valgud, mis on tuntud ka kui antikehad ehk immunoglobuliinid (Ig). Antikeha on monomeerina Y-kujuline, selle moodustavad neli polüpeptiid ahelat, kaks identset rasket ning kaks identset kerget ahelat, mis on omavahel ühendatud disulfiidsildade abil. Nii raskel kui ka kergel ahelal esineb konstantne ja variaabel domeen (Janeway CA Jr et al., 2001) Antikeha struktuuri on näidatud Joonis 1. Antikehad võivad olla kehas ringluses, kui need on sekretoorses vormis või võivad olla seotud B-lümfotsüüdi membraaniga. Antikehad jagatakse konstantse domeeni põhjal 5 klassi: IgA, IgD, IgE, IgG ning IgM (Schroeder & Cavacini, 2010).

Antikeha olulisemaks funktsiooniks on antigeeniga seondumine. Antigeenina toimivad erinevad makromolekulid või keemilised ühendid (Saper, 2009). Antikeha variaabel domeen tunneb ära ning seondub antigeenil asuva epitoobiga. Seondumine toimub mitte-kovalentsete sidemete abil ning sõltuvalt struktuurilisest kokkusobivusest ja aviidsusest võib olla kas tugev või nõrk (Janeway CA Jr et al., 2001; Reverberi & Reverberi, 2007).

Kui antikeha on seondunud antigeeniga on immuunsüsteemi järgmiseks etapiks vabaneda antigeenist. Antikehad aitavad protsessile kaasa, sest neil on võimalik esile kutsuda konformatsioonilisi muudatusi ja seeläbi takistada antigeeni seondumist peremehe rakkudega, vähendada antigeeni kandjate liikuvust ja seeläbi ka levimist peremehes ning põhjustada agregatsiooni. Kõik need tegevused aitavad neutraliseerida ehk inaktiveerida antigeeni, millele järgneb selle lagundamine, mida viib läbi kas komplemendi süsteem või immuunsüsteemi effektorrakud (Forthal, 2014).



Joonis 1. Antikeha struktuur. Antikeha koosneb kahest identsest kergest ja raskest ahelast. Neil esineb variaabel ja konstantne domeen. Ahelad on seotud disulfiidsildade abil. Kohandatud ("Antibody," n.d.).

1.1.2. Autoantikehad

Autoantikehad seonduvad organismist pärinevate autoantigeenidega, milleks võivad olla mitmed eri molekulid nagu näiteks valgud, lipiidid, süsivesikud või kombinatsioonid nendest kolmest. Nende asukoht rakus võib varieeruda, need võivad esineda rakusisestel membraanidel, tuumas, tsütoplasmas või raku välismembraanil. Autoantigeenid on laia spetsiifikaga, nendeks võivad olla näiteks tuumavalgud, mille tõttu on mõjutatud väga paljud rakutüübid, aga need võivad olla organspetsiifilised kui autoantigeeniks on näiteks valgud, mis esinevad ainult ühes kindlas rakutüübis. Autoantikehi võib leiduda ka rakuväliste autoantigeenide vastu, milleks võivad olla erinevad sekreteeritavad valgud nagu näiteks tsütokiinid (Elkon & Casali, 2008). Autoantikehad saavad mitmel moel mõjutada autoantigeeni sisaldavaid rakke. Peale selle, et need saavad esile kutsuda raku lüüsumise on autoantikehad võimelised ka muutma või blokeerima seal olevaid signaaliülekanderadu takistades normaalseid funktsioone ning näiteks esile kutsuma põletikulise vastuse raku vastu (Ludwig et al., 2017).

Autoantikehade tekkeks on vajalik autoreaktiivsete B-lümfotsüütide olemasolu. B-rakkude arengul on paigas mehhanismid, mis kontrollivad B-raku retseptori (BCR) afiinsust autoantigeenide vastu ning enamik kõrge autoreaktiivsusega B-rakke suunatakse rakusurma ehk apoptoosi või neil tekib anergia ehk nad kaotavad oma võime antigeenidele reageerida (Abbas et al., 2014). Kontrollmehhanismidest on võimelised mööda saama ja küpseks saama need autoreaktiivsed B-

rakud, mille afiinsus autoantigeenidele on madal ja kui neil esineb polüreaktiivsust. (Ludwig et al., 2017). Autoantikehade taseme hoidmiseks on vaja, et aktiveeritud B-rakkudest areneks pidevalt lühikese elueaga plasmarakke ning et pikaealised plasmarakud, mis saaksid tsirkulatsiooni minna (Cambier et al., 2007).

Autoantikehi tootvaid B-rakke leidub igas indiviidis. Seejuures on leitud erinevusi haigestunute ja tervete inimeste autoantikehade klassi ning koguse vahel. Tervetel inimestel on tavaliselt madal autoantikehade tase ning levinumaks klassiks on IgM autoantikehad, mida nimetatakse ka „loomulikeks autoantikehadeks“. Need autoantikehad on keskmise afiinsusega ning polüreaktiivsed, mis tähendab, et nad on võimelised seonduma mitme erineva antigeeniga seal hulgas autoantigeenidega (Avrameas et al., 2018; Elkon & Casali, 2008). Inimestel, kes põevad autoimmuunhaigusi nagu näiteks reumatoid artriit (RA) või ka süsteemne erütematoosne luupus (SLE) on kirjeldatud kõrget IgG klassi kuuluvate autoantikehade taset (Boes et al., 2000). IgG antikehadel on kõrgem afiinsus kui IgM klassi autoantikehadel ning IgG klassis esineb ka rohkem somaatilisi mutatsioone (Mannoor et al., 2013).

Autoantikehade taseme tõusu on nähtud tervetes vanurites (Manoussakis et al., 1987). Mehhanismid selle taga pole päris selged. Levinud hüpoteesi kohaselt on tase kõrgem, sest immuunrakkudel on olnud palju kestvaid kokkupuuted autoantigeenidega. Nende rohkuse on tinginud erinevad kahjustused, mida organism on oma eluea jooksul kogenud ning ka immuunrakkude pidevast kontaktist apoptoosi läinud rakkudega (Wick et al., 2003).

1.2 Tsütokiinid

Rakud suhtlevad omavahel kasutades väikeseid sekreteeritavaid signaalvalke, mida nimetatakse tsütokiinideks. Kuna need valgud on vajalikud paljudeks rakusisesteks protsessideks nagu näiteks kasvamine ja küpsemine, on neid võimelised tootma mitmed rakkude populatsioonid, kusjuures eri rakud võivad toota samu tsütokiine, näiteks saavad nii fibroblastid kui ka makrofaagid produtseerida CXCL-8. Tsütokiinid võivad mõjuda: samale rakule, kust neid sekreteeriti, ehk olla autokriinsed, naaberrakkudele ehk olla parakriinsed või hoopis liikuda mööda vereringet, mõjutades kaugemal asuvaid rakke ehk olla endokriinsed. Tsütokiinide puhul on kirjeldatud pleiotroopiat, mis tähendab, et üks tsütokiin nagu näiteks IL1-α saab mõjuda mitmele rakutüübile. Signaaliülekanne toimub valgu ja raku pinnal olevate retseptorite seondumisel (Foster, 2001; J.-M. Zhang & An, 2007).

Tsütokiinide poolt edastavatel signaalidel on mõju n ka muudele protsessidele kui nendele, mis eelnevalt mainitud. Tsütokiinid võivad käivitada rakus kaskaade, mis viivad apoptoosini. Immuunsüsteemi jaoks vahendavad need olulisi signaale, mis reguleerivad põletiku vastust, seda esile kutsudes või takistades ning hiljem ka kudede paranemist (Foster, 2001). Lisaks mõjutab nende signaal ka järgmiste tsütokiinide sekreteerimist rakust ning võimendab või inhibeerib teiste tsütokiinide ning hormoonide signaale rakule (J.-M. Zhang & An, 2007).

Tsütokiinide hulka kuuluvad interleukiinid (IL), kemokiinid, interferoonid (IFN), kasvaja nekroosifaktorid ja kolooniat stimuleerivad faktorid. Neil kõigil on omad funktsioonid, näiteks interleukiinid on olulised eelkõige just immuunsüsteemi jaoks, sest nad on võimelised aktiveerima erinevaid immuunrakke ning neist pärinevad signaalid on vajalikud nende immuunrakkude edasiseks arenguks. Lisaks on paljudel IL signaalidel mõju põletikule, sest need võivad seda soodustada või pidurdada (Justiz Vaillant & Qurie, 2022).

1.2.1. Interleukiin 1-alfa ja põletik

Interleukiin 1 tsütokiinide perekonna moodustavad 11 liiget. Selle perekonna tsütokiinide tähtsust on täheldatud erinevate autoimmuunhaiguste ning nakkushaiguste puhul, sest need, omavad olulist rolli põletikuvastuste reguleerimises (Dinarello et al., 2012).

IL1 Perekonda kuuluva IL1-α on organismis alarmini rollis, sest see on üks esimestest tsütokiinidest, mis vabaneb rakkudest põletiku korral (Mantovani et al., 2019). Seda interleukiini on võimelised tootma mitmed rakutüübid ning see toimub pidevalt epiteeli, endoteeli ja strooma rakkudes ning fibroblastides, kuid kui rakud on hematopoeetilist päritolu nagu näiteks makrofaagid vajavad nad IL1-α sünteesi alustamiseks signaali (Malik & Kanneganti, 2018; Weber et al., 2010). Kui IL1-α on raku sees, siis esineb see ebaküpses vormis ja enne proteaasiga töötlust ei saa toimuda üleminekut küpsesse vormi.

IL1-α tavaolukorras rakkudest ei välju. Apoptoosi minekul viiakse rakus olev IL1-α rakutuuma, kus see seondub seal asuva kromatiiniga. Kui IL1-α on seondunud, siis ta enam ei vabane kromatiinilt, mis tähendab, et jääb inaktiivseks kuni rakk koos IL1-α-ga lõpuks makrofaagi poolt lagundatakse (Dinarello, 2011). Kui tegu on rakuga, mis on olnud kõrges stressis näiteks: radiatsiooni, kuumuse või patogeenide tõttu, ei lähe see tavalisse rakusurma vaid hoopis nekroosi. Seda tüüpi surma puhul on iseloomulik plasmamembraani lõhkemine, mistõttu raku sisu väljub rakuvälisesse ruumi (D'Arcy, 2019). Tänu sellele vabaneb IL1-α ja saab seonduda oma

retseptoritega, et käivitada põletikureaktsioonid. See nekroosist sõltuv vabanemine annab immuunsüsteemile märku, et on toimunud koekahjustused.

IL1-α retseptoriks on interleukiin 1 retseptor tüüp 1 (IL1R1), mis on leitav pea igal kaasasündinud immuunsüsteemi rakutüübil (Mantovani et al., 2019). Aktiveeritud retseptorist saab alguse kaskaadide rada, tänu millele aktiveeritakse geenid ja hakatakse tootma teisi põletikku soodustavaid tsütokiine. Tähtsamateks nende hulgas on CXCL-8 ja IL-6 (Schett et al., 2016). Antud kaskaad toimub positiivse tagasiside põhimõttel, kus tsütokiinid, mille süntees algas tänu IL1-α-le, indutseerivad edasi IL1-α sekretsiooni (Malik & Kanneganti, 2018).

Signaalmolekulid, mis vabanesid tänu IL1-α induktsioonile, reageerivad erinevate immuunsüsteemi rakkudega (Schett et al., 2016). Signaali alguskohta liiguvad neutrofiilid ja monotsüüdid, ning algab immuunvastus.

Immuunvastus väljendub põletiku tekkes. Põletik võib tekkida mingi ärritaja või vigastuse toimel ja on vajalik, et immuunsüsteem saaks selle kehast eemaldada, kaitstes samal ajal kõrvalasuvaid kudesid (Medzhitov, 2010). Põletiku tekkeks on vaja põletikku soodustavatelt tsütokiinidelt signaale, mis muudavad veresoonte läbilaskvust ning kutsuvad sinna asukohta leukotsüüte (Ferrero-Miliani et al., 2007). Samal ajal kui sekreteeritakse põletikku soodustavaid tsütokiine algab põletiku mediaatorite süntees, milleks on põletikuvastased tsütokiini ja lipiidid nagu defensiinid, mille eesmärk on lõpetada põletikuvastus ja taastada koed nagu nad olid enne vigastust või nakatumist. Seda teevad nad tsütokiinide produktsiooni kontrollides, takistades immuunrakkude liikumist põletiku kohta ja kudede parandamise algatamise läbi (Freire & Van Dyke, 2013).

Kui põletiku mediaatorite süntees on häiritud, võivad põletiku soodustavad tsütokiinid nagu IL1-α tekitada kehas kroonilist põletikku. See on iseloomulik mitmetele autoimmuunhaigustele nagu näiteks reumatoidartriit (RA). Pikaaegne põletik kahjustab kudesid eriti just liigestes ja põletikuga kaasnev valu langetab elukvaliteeti. Seetõttu on kasutusele võetud ravimeid, mis blokeerivad selle retseptorit, et inhibeerida põletiku teket (Dinarello et al., 2012).

1.2.2. CXCL-8

kemokiin CXCL-8 (C-X-C motiiviga ligand 8) kuulub CXCL perekonda. Varasemalt kandis see kemokiin interleukiin-8 (IL-8) nime ja seetõttu on kirjanduses kasutusel mõlemad versioonid.

CXCL-8 osaleb mitmes protsessis, mis on immunsüsteemi toimimiseks väga olulised, nagu angiogenees, haavade paranemine ja neutrofiilide kemotaksiseks (neutrofiilide liikumine põletikukoldesse) (Jiang et al., 2012; Russo et al., 2014).

Rakud ei tooda tavaolekus CXCL-8 sellises koguses, et see mõjutaks ümbritsevaid rakke, vaid see vajab signaali. Rakkudes missaavad signaali toimub, selle tulemusena geenide ülesregulatsioon ja tootmine ning sekretsioon tõuseb. See signaal võib pärineda teistelt tsütokiinidelt nagu IL1-α või ka IL-6 ja TNF-α. Produktsiooni tõusu on nähtud ka rakkudes, mis on kogenud keskkonnast tingitud stressi (Ha et al., 2017).

Mitmed erinevat rakutüübid on võimelised CXCL-8 tootma, nende hulgas: endoteeli, epiteeli ja mesoteeli rakud, lisaks veel neutrofiilid, fibroblastid ning monotsüüdid (Qazi et al., 2011). CXCL-8 on võimeline ära tundma 3 retseptorit: CXCLR1, CXCLR2 ja DARC. Kõik kolm retseptorit on ekspresseeritud granulotsüütidel, monotsüütidel, lümfotsüütidel, epiteel- ja endoteelirakkudel ning fibroblastidel (Jiang et al., 2012).

CXCL-8 kõrgenenud taset on märgatud teatud pahaloomuliste kasvajatega nagu põievähk (Koçak et al., 2004).Seetõttu võib oletada, et CXCL-8 on võimalik rakendada ka kui biomarkerit (Shahzad et al., 2010). COVID-19 puhul on kõrgenenud CXCL-8 tasemed tihtipeale seotud raskema prognoosiga (Nagant et al., 2020).

1.3 IL1-α vastased autoantikehad

1989. aastal kirjeldati esmakordselt antikehi, mis olid tsütokiini IL1-α vastased. Nendest autoantikehadest kuulub valdav enamus kõrge afiinsusega IgG antikehade klassi (Svenson et al., 1989). IL1-α autoantikehade puhul on oluline teada saada, kas nad omavad neutraliseerivat aktiivsust. IL1-α on võimalik neutraliseerida, kui selle vastased antikehad ei lase sellel oma retseptoriga seonduda ja rakuni ei jõua signaal, mis viiks põletiku väljakujunemiseni (Miossec, 2002).

Autoimmuunhaigusi põdevatel inimestel on tuvastatud IL1-α autoantikehade tase, mis on mitmeid kordi kõrgem kui tervetel inimestel (Suzuki et al., 1991). Selle kõrgendatud taseme tõttu saab kasutada IL1-α vastaseid antikehi biomarkerina autoimmuunhaiguste nagu näiteks RA puhul (Wahid Ali Khan, 2019). Seda haigust iseloomustab pikaaegne põletik liigestes, mis annab keha immuunrakkudele palju kokkupuuteid IL1-α kui antigeeniga ja nad võivad seetõttu hakata

autoantikehi IL1-α vastu sünteesima. Kui patsiendil esineb kõrge neutraliseerivate autoantikehade tase, siis on tal tõenäoliselt oodata kergemat haiguse kulgu, sest ei teki nii ägedat põletikureaktsiooni (Jouvenne et al., 1997).

1.4. Autoantikehad SARS-CoV-2 viiruse korral

SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) on RNA viirus, mis kuulub koroonaviiruste perekonda ning millest sai 2020. aastal alguse ülemaailmne pandeemia. Viirus põhjustab inimestel haigust COVID-19 ning 2022. aasta märtsi seisuga on registreeritud üle 480 miljoni haigusjuhu ning 6,2 miljonit surma (*WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*, n.d.).

Viirus levib peamiselt piisknakkuse kaudu, mille tõttu on see võimeline levima väga kiirelt (R. Zhang et al., 2020). Kõige tavapärasemad sümptomid on palavik, köha, kurguvalu ja väsimus (Alimohamadi et al., 2020). Enamik nakatunutest põeb seda haigust kergete sümptomitega. Raskemalt põdemise oht on inimestel, kes kuuluvad riskigruppidesse, nagu näiteks vanurid ja autoimmuunhaigustega inimesed, sest neil võib välja kujuneda kopsupõletik ja nad võivad vajada haiglaravi (Williamson et al., 2020).

COVID-19 nakatunutel on kirjeldatud autoantikehade olulisust haiguse kulgemisel. Autoantikehad, mille olemasolul immuunsüsteemi funktsioonid on häiritud, on näiteks tüüp I interferoonide (I IFN) vastased autoantikehad. Mille kõrged tasemed esinesid kriitilises seisus patsientidel, aga mitte neil patsientidel, kellel möödus haigus mõõdukalt. Blokeerides tüüp I IFN ei saa toimuda normaalset immuunsüsteemi vastust viiruse vastu ning see võib olla üks põhjustest, miks osadel inimestel kulgeb haigus nii raskelt, et nad vajavad intensiivravi (Bastard et al., 2020). COVID-19 puhul on kirjeldatud ka põletikuliste tsütokiinide nagu IL-6 suurt tõusu (Wu et al., 2021). Tekkiv põletik on oluline immuunvastuse jaoks, kuid see kahjustab ka patsiendi kudesid, mis võivad viia aeglasema taastumiseni, eriti kui kahjustada saavad elundid nagu kopsud.

COVID-19 nakkuse puhul on mitmetes patsientide kirjeldatud antikehade produktsiooni tõusu. Autoantikehad on suunatud tihtipeale põletikuliste tsütokiinide nagu IL-6 ja kemokiinide vastu.

Kõik need viitavad autoantikehade ja COVID-19 seoste keerulisele rollile kehas, omades patsiendile nii positiivset kui ka negatiivset mõju ja kindlasti vajab teema edasist uurimist.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Eksperimentaalse töö eesmärgid:

a) Määrata IL1-α antikehade tase uuritavates valimites (tavapopulatsioon, TÜK Sisekliinik, TÜK Nahahaiguste kliinik ja COVID-19 läbipõdenud)
b) Uurida vanuse ja IL1-α autoantikehade taseme vahelist seost
c) Võrrelda IL1-α autoantikehade esinemissagedust erinevates valimites
d) Määrata IL1-α antikehade suhtes positiivsetes seerumites nende neutraliseerimisvõimet

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1 Valimi kirjeldus

Antud töösse kaasati 849 inimese vereplasmat, mis pärinesid Tartu Ülikooli Kliinikumi (TÜK) Sisekliinikust, TÜK Nahahaiguste kliinikust, KoroSero-EST-1 uuringust ja TÜK ja Lõuna-Eesti Haigla COVID-19 läbipõdenute uuringust. Valimid on kajastatud Tabel 1. Inimuuringute eetikakomitee väljastas kooskõlastused proovide kasutamiseks: 312/T-1, 318/T-, 275/M-17 ja 272/T-12

Patsientidelt TÜK Sisekliinikust ja Nahahaiguste kliiniku patsientidest koguti 8 ml verd, ülejäänud indiviididelt koguti 10 ml veeniverd, millest eraldati plasma. Proovid on kogutud ja töödeldud teiste laboritöötajate poolt.

Tabel 1. Uuritavad valimid, kirjeldatud on proovide arvu, soolist jaotust, esinevat vanusevahemikku ja inimeste keskmisi vanuseid.

	TÜK Sisekliinik	TÜK Nahahaiguste kliinik	KoroSero-EST-1 (Tavapopulatsioon)	COVID-19 läbipõdenud
Proovide arv	295	228	176	162
Naised	211	138	97	93
Mehed	84	90	79	69

Vanusevahemik	65-98	65-95	2-92	21-91
Keskmine vanus	76	75.3	44.3	56.2

COVID-19 läbipõdenute grupis olid proovid kogutud 3 kuud peale nakkuse lõppu. Proovid olid jagatud nelja rühma, mis põhinevad WHO (*World Health Organization*) COVID-19 haiguse raskusastme klassifikatsioonil (*Living Guidance for Clinical Management of COVID-19*, 2021) (Tabel 2).

Tabel 2. WHO COVID-19 haiguse raskusastme klassifikatsioon.

	WHO 0 Kontroll	WHO 1 Kerged sümptomid	WHO 2 Mõõdukad sümptomid	WHO 3 Rasked sümptomid	WHO 4 Kriitiline seis
Patsientide arv	49	16	42	36	20
Klassifikatsiooni alus	Ei esinenud COVID-19 nakkust	Ei esine kopsupõletikku	Esineb kopsupõletik Hapniku saturatsioon toaõhus ≥ 90%.	Esineb kopsupõletik Hingamissagedus ≥30 hinget/min või Hapniku saturatsioon oli toaõhus < 90%	Esines äge respiratoorse disstressi sündroom (ARDS, *acute respiratory distress syndrome)* ja Septiline šokk

2.2.2. Rakuliinid ja söötmed

Uuringus kasutati IL1-α tundlikku inimese normaalsete naha fibroblastide rakuliini (NHDF, *Normal Human Dermal Fibroblasts*, Lonza). Rakke kasvatati 10 cm läbimõõduga koekultuuri tassidel (Cellstar), 10 ml DMEM (*Dulbeccoś modified eagle medium,* Lonza) söötmes, millele oli lisatud 10% 56 ºC juures inaktiveeritud veise loote seerumit (FBS, *Fetal Bovine Serum*, Gibco), lisaks ka 1% lahust, mis sisaldas: penitsilliini 10000 ühikut/ml, streptomütsiini 10mg/ml ja amfotertsiini 25 µg/ml (Corning). Rakud kasvasid koekultuuri inkubaatoris (*CO_2 incubator*, Sanyo) 37 ºC ning 5% CO_2 kontsentratsiooni juures.

Rakkudega töötati edasi, kui nad olid saavutanud kõrge tiheduse ehk täitsid umbes 80% tassi pinnast. Töö algas vana söötme eemaldamisega ning seejärel pesti tassi 5 ml PBS×1-ga (*Phosphate Buffered Saline,* Bioatlas). Tassile lisati 1 ml trüpsiini (Corning) ja inkubeeriti 12 minutit 37 °C

ning 5% CO_2 kontsentratsiooni juures koekultuuri inkubaatoris. Seejärel pesti tassi 10 ml DMEM söötmega, mis koguti 15 ml katsutisse. Pesu korrati, lisades tassile 5 ml PBS×1, mis koguti samasse katsutisse. Segu tsentrifuugiti (5810 R,18 rad, Eppendorf) 10 min 300 × g juures. Katsutist eemaldati kogu sööde ja rakusade suspendeeriti 5 ml DMEM söötmes.

Rakkude lugemiseks võeti 18 µl rakususpensiooni, millele lisati 2 µl akridiin oranži fluorestseeruvat värvi (*Acridine Orange,* Logos). Lugemine teostati kasutades rakulugejat (Luna, *Dual Fluorescence Cell Counter*, Logos).

2.2.3. LIPS (*Luciferase immunoprecipitation system*)

IL1-α autoantikehade taseme määramiseks kasutati lutsiferaasil põhinevat immuunsadestamise meetodit (LIPS). Selleks tehti kogutud plasmadest 25 µl kordset lahjendused kasutades puhver A-d (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 1% Triton X-100), mis kanti 96-kannusele mikrofilterplaadile (Millipore). Igale analüüsitud plaadile kaasati alati kaks negatiivset ja üks positiivne kontroll. Seejärel lisati kannudesse 25 µl proteiin G agarooskerade suspensiooni (*Protein G Agarose High Flow Resin*, Creative BioMart, Inc). Plaati inkubeeriti loksutil (RockingShaker, Ohaus) 1 tund toatemperatuuril. Seejärel lisati 50 µl IL1-α antigeeni, mis sisaldas 10^6 LU-d (luminestsentsi ühik). Inkubatsiooni korrati ning plaat oli 1 tunni loksutil toatemperatuuril. Peale seda pesti plaati vaakumsüsteemil (Millipore) 4 x 150 µl puhver A-ga ja seejärel 4x 150 µl 1×PBS. Seejärel lisati plaadile 20 µl lutsiferaasi (Nano Glo™ Lutsiferase Assay Substrate, Promega, Inc.) 1000-kordset lahjendust. Lutsiferaasi poolt tekitatud valguse signaali intensiivsust mõõdeti kasutades VICTOR X *Multilabel Plate reader*-it (PerkinElmer Life Sciences). Väärtused saadi luminestsentsi ühikutes (LU).

Antud töö autor teostas LIPS analüüsi 699 prooviga, mis koguti TÜK Sisekliinikus, TÜK Nahahaiguste kliinikus ja KoroSero-EST-1 uuringu raames. COVID-19 läbipõdenute proovidega teostasid LIPS analüüsi teised uurimisgrupi liikmed.

2.2.4. IL1-α autoantikehade neutraliseerimisvõime testimine

IL1-α neutraliseerimisvõime testimiseks kanti 96-kannuselisele 1:5 kasutades DMEM söötmes lahjendatud vereplasma. Seejärel lisati plasmadele 50 µl IL1-α (BioLegend) lahjendust, kontsentratsiooniga 100 pg/ml. Igal plaadil asusid ka kontrollproovid, nullprooviks oli 100 µl

DMEM sööde. Positiivne kontroll koosnes DMEM söötmest ja IL1-α (100 pg/ml) lõppkontsentratsiooniga (50 pg/ml). Plaati inkubeeriti üks tund koekultuuri inkubaatoris 37 °C ning 5% CO_2 juures. Inkubatsiooni lõppedes lisati igasse kannu 20000 NHDF rakku. Plaati inkubeeriti üleöö 37 °C ning 5% CO_2 koekultuuri inkubaatoris. Pärast inkubeerimist koguti rakkudelt supernatant, mis hoiustati järgmiste katseteni -20 ^{o}C juures.

2.2.5. CXCL-8 mõõtmine ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) meetodiga

Stimulatsioon IL1-α-ga põhjustab rakkudes CXCL-8 sekreteerimise märkimisväärset tõusu. Mõõtes CXCL-8 kogust on näha, kas autoantikehad on seondunud IL1-α-ga, sest kui on toimunud neutraliseerimine ei ole rakud saanud signaali, mis viiksid CXCL-8 produktsiooni tõusule.

Et saada teada, kas plasmas on autoantikehasid, mis on võimelised IL1-α toimet neutraliseerima, kasutati immunoensüümmeetodit (ELISA). Selleks kasutati *ELISA MAX^{TM} Deluxe Set Human IL-8* (Cat. No. 731504, BioLegend) komplekti vastavalt tootja protokollile. Katse viidi läbi kõrge siduvusega 96-kannulisel plaadil (Greiner Bio One), mille igasse kannu pipeteeriti kõigepealt 100 µl primaarset antikeha (*Capture Antibody)* ning seda inkubeeriti üleöö 4 °C juures.

Järgmisel hommikul pesti plaati 4 korda 300 µl pesupuhvriga (PBS x 1 + 0,05% Tween-20) *Wellwash* masinaga (Thermo Scientific). Pärast pesu lisati igasse kannu 200 µl blokeerimislahust *Assay diluent* ning proove inkubeeriti 1 tund loksutil toatemperatuuril. Seejärel pesti plaati 4 korda 300 µl pesu puhvriga. Plaadile lisati 100 µl lahjendusega 1:100 peatükis 2.2.4. kogutud supernatanti ning IL-8 standardi seeria lahjendusi vahemikus 1000-15,6 pg/ml. Kõik lahjendused valmistati kasutades lahust *Assay Diluent.* ning plaati inkubeeriti loksutil 2 tundi toatemperatuuril. Peale inkubatsiooni pesti plaati 4 korda 300 µl pesupuhvriga. Peale seda lisati igale proovile 100 µl detekteerimise antikeha (*Detection antibody)* lahust ning inkubeeriti loksutil 1 tund. Järgmisena pesti plaati 300 µl pesu puhvriga 4 korda. Seejärel lisati igasse kannu 100 µl lahust *Avidin-HRP* ning inkubeeriti loksutil 30 minutit toatemperatuuril. Peale inkubatsiooni pesti plaati 5 korda 300 µl pesupuhvriga ning peale igat tsüklit lasti plaadil seista 30 sekundit. Peale pesusid lisati 100 µl lahust *Substrate solution C* ning plaati inkubeeriti pimedas toatemperatuuril 15 minutit. Reaktsiooni peatamiseks lisati igasse kannu 100 µl stopp lahust (2M H_2SO_4, Applichem). Seejärel mõõdeti proovide optiline tihedus lugejaga *Multiscan MCC/340 ELISA* (Labsystems). Mõõtmised toimusid 450 nm ja 540 nm juures. Täpsemalt seletatakse arvutusi IL1-α taseme leidmiseks peatükis 2.3.4.

2.2.6. Andmeanalüüs

Kogutud andmete töötlemiseks ja visualiseerimiseks kasutati Microsoft Exceli (Microsoft) programmi. Töös kasutati χ^2-testi ja paaritut t-testi. Statistiliselt oluliseks loeti tulemusi, kui $p<0.05$.

2.3. Tulemused

2.3.1. LIPS katse korratavus

LIPS plaatidega sooritati kahel päeval variatsioonikatsed, et kinnitada LIPS tulemuste usaldusväärsust. Igal plaadil olid samad 11 proovi 8 kordusena.

Paralleelidevahelise varieeruvuse leidmiseks arvutati mõlema päeva proovi keskmine ning standardhälve. Nende väärtuste põhjal arvutati välja variatsioonikordajad. Võttes mõlemast variatsioonikordajast keskmine leiti, et kahe päeva plaatidel olevate proovide paralleelide vahel oli varieeruvus 15%. Standardhälve arvutati mõlema päeva proovide keskmiste põhjal, ning see oli 5%. Päevade vaheline variatsioon arvutati kasutades allolevat valemit.

$$\frac{|\ 1.\text{päeva proovi keskmine väärtus} - 2.\text{päeva proovi keskmine väärtus}\ |}{(\ 1.\text{päeva proovi keskmine väärtus} + 2.\text{päeva proovi keskmine väärtus})/2} * 100$$

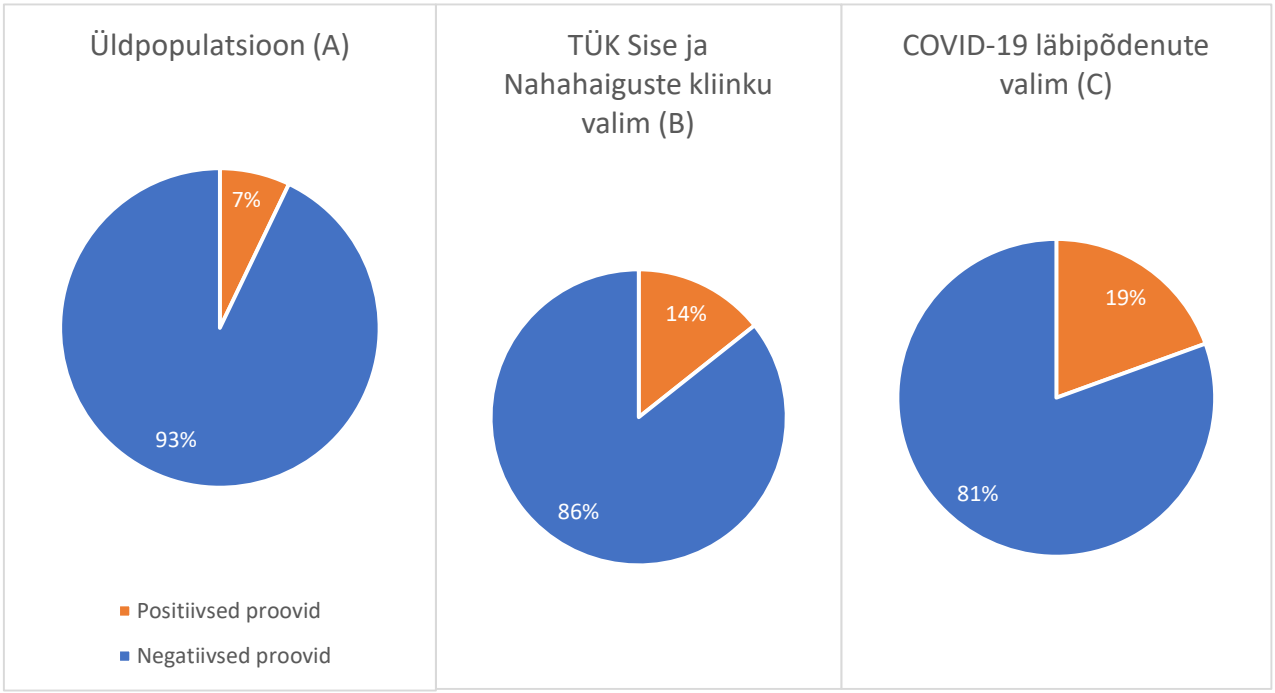
Päevade vahelise variatsiooni leidmiseks võeti kõikide proovide variatsioonide keskmine ja leiti, et variatsioon päevade vahel oli 9% (SD 8%). Mõlemad tulemused iseloomustavad katse head korratavust ning täpsust IL1-α autoantikehade määramisel.

2.3.2. IL1-α autoantikehade taseme määramine LIPS analüüsil

LIPS katsetega määrati proovides olev IL1-α autoantikehade tase. Kasutades VICTOR-X *Multilabel Plate Reader*-it saadi teada luminestsentsi signaali tugevus (LU) igas proovis. Mida rohkem IL1-α autoantikehi proovis leidus, seda kõrgem on LU väärtus. Plaadil olid kõik proovid ning kontrollid kahe kordusena. Edasistel arvutustel võeti kasutusse nende keskmine LU väärtus.

Kuna iga LIPS mõõtmine on väikese varieeruvusega, siis täpsuse nimel kasutati proovidel LIPS suhte väärtust, et määrata IL1-α autoantikehade taset. LIPS suhte leidmiseks jagati proovi keskmine LU väärtus plaadil olevate negatiivsete kontrollide keskmisega. Suhe näitab, mitmekordselt erineb autoantikehade tase proovist võrreldes negatiivse kontrolliga ning seda väljendatakse logaritmitud suhteliste ühikute (SÜ) abil.

Proovid jagati IL1-α taseme alusel positiivseteks ja negatiivseteks. Jagamine toimus LIPS suhte põhjal, kasutades üldpopulatsiooni, mis moodustati KoroSero-EST-1 proovidest ja COVID-19 läbipõdenute grupi WHO 0 proovidest. Piiri leidmiseks eemaldati analüüsist 5% kõrgematest ja 5% kõige madalamatest proovidest. Allesjäänud proovide põhjal arvutati välja keskmine ja standardhälve. Positiivseid ja negatiivseid proove eraldav piir leiti, liites proovide keskmisele 3 standardhälvet. Saadud piiri rakendati kõikidele valimitele. Valimite positiivsete proovide osakaal oli järgnev: tavapopulatsiooni läbilõikes olid positiivsed 7% proovidest (Joonis 2 A). TÜK Sisekliinikust ja Nahahaiguste kliinikust kogutud proovidest olid positiivsed 14% (Joonis 2 B) ja COVID-19 haigete valimis oli positiivseid 19% proovidest (Joonis 2 C).



Joonis 2. Positiivsete proovide osakaal (A) üldpopulatsioonis (B) TÜK Sisekliiniku ja TÜK Nahahaiguste kliiniku valimites (C) COVID-19 läbipõdenute populatsioonis. Suurem IL1-α autoantikehade tase esines valimites, mis pärinesid kliinikutest ja COVID-19 läbipõdenutelt.

Leiti oluline erinevus LIPS suhetes, kui võrreldi üldpopulatsiooni ja TÜK Sisekliiniku ning Nahahaiguste kliiniku valimeid ($p=0.033385$). Kliinikutest kogutud populatsioonides esines rohkem positiivseid proove. Sarnaselt leiti ka, et COVID-19 läbipõdenute populatsioonis esineb võrreldes üldpopulatsiooniga rohkem kõrge IL1-α autoantikehade tasemega proove ($p=0.010578$).

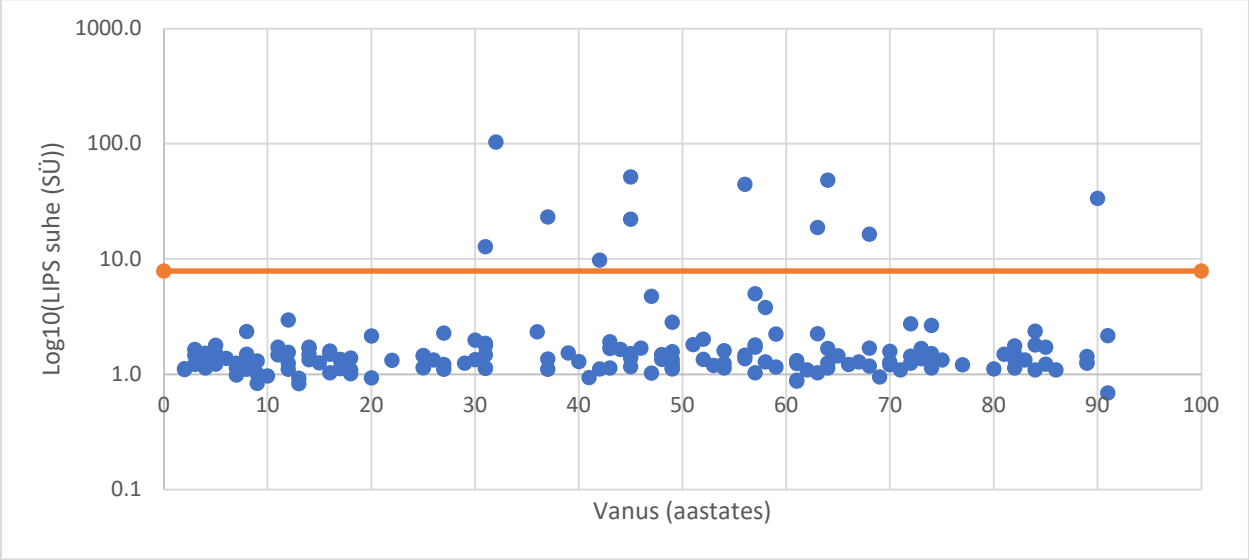
Neutraliseerimis katsesse kaasati 69 positiivset proovi, mis omasid kõrget LIPS suhte väärtust. Proovid pärinesid kõikidest valimitest. Kontrollideks võeti 8 negatiivset väärtust omavat proovi.

2.3.3. IL1-α autoantikehade taseme seos vanusega

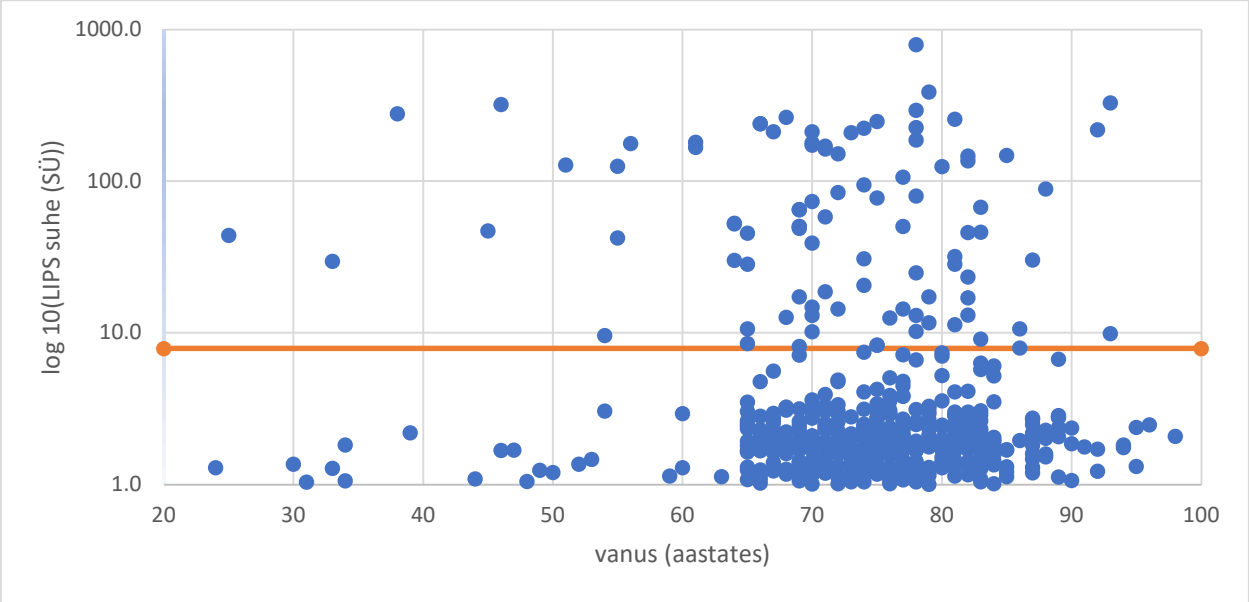
Üheks töö eesmärgiks oli saada teada, kas vanuse ja IL1-α autoantikehade sekreteerimis koguse vahel on seos. LIPS analüüsil määratletud autoantikehade tasemed viidi kokku proovi andnud inimese vanustega, neid seoseid on näha Joonis 3 ja Joonis 4. Tavapopulatsiooni hulgas (Joonis 3) esines kõrgem IL1-α autoantikehade tase vaid üksikutes proovides, esimesed kõrgema tasemega proovid pärinesid inimestelt, kes olid üle 30 aasta vanad. Tartu Ülikooli Kliinikumist pärinevate proovide ja COVID-19 läbipõdenute hulgas oli näha märkimisväärset antikehade taseme tõusu võrreldes tavapopulatsiooniga ja see tõus esineb ka nooremate seas nagu on näha **Error! Reference source not found.**.

Vanuse rolli teada saamiseks kasutati tavapopulatsiooni läbilõiget (KoroSero-EST-1 proovid), mis jagati vanuse järgi kaheks grupiks. Ühe grupi moodustasid nooremad ehk alla 65 aasta vanused inimesed ning teises grupis olid vanurid ehk üle 65 aasta vanused inimesed. Sooviti teada saada, kas esineb erinevus IL1-α autoantikehade tasemes nooremate ja vanemate isikute vahel. Positiivsete proovide arv alla 65-aastaste hulgas oli 7% ja üle 65-aastaste hulgas 5%.

Uurimiseks sooritati 2 statistilise analüüsi testi. Kõigepealt võrreldi vanusegruppe omavahel sõltumatutute andmete t-testi (*unpaired t-test*) abil. Tavapopulatsiooni läbilõikes ei esinenud statistiliselt olulist erinevust kahe vanusegrupi vahel, ($p=0.4459$; statistiliselt oluline kui $p<0.05$). Lisaks sooritati χ^2-test, et võrrelda positiivsete ja negatiivsete proovide arvu (<65) ja (>65) grupis. Ka selle testi tulemus kinnitas, et tavapopulatsiooni valimis ei esine alla 65 ja üle 65 aastaste gruppide vahel erinevusi IL1-α spetsiifilise antikehade seondamisel erinevusi ($p=0.97996$).



Joonis 3.IL1-α autoantikehade kogus tavapopulatsiooni läbilõikes. LIPS tulemusetel saadud suhe (SÜ) on pandud kümnendlogaritmis. Oranži joonega on märgitud positiivsus-negatiivsus piir.

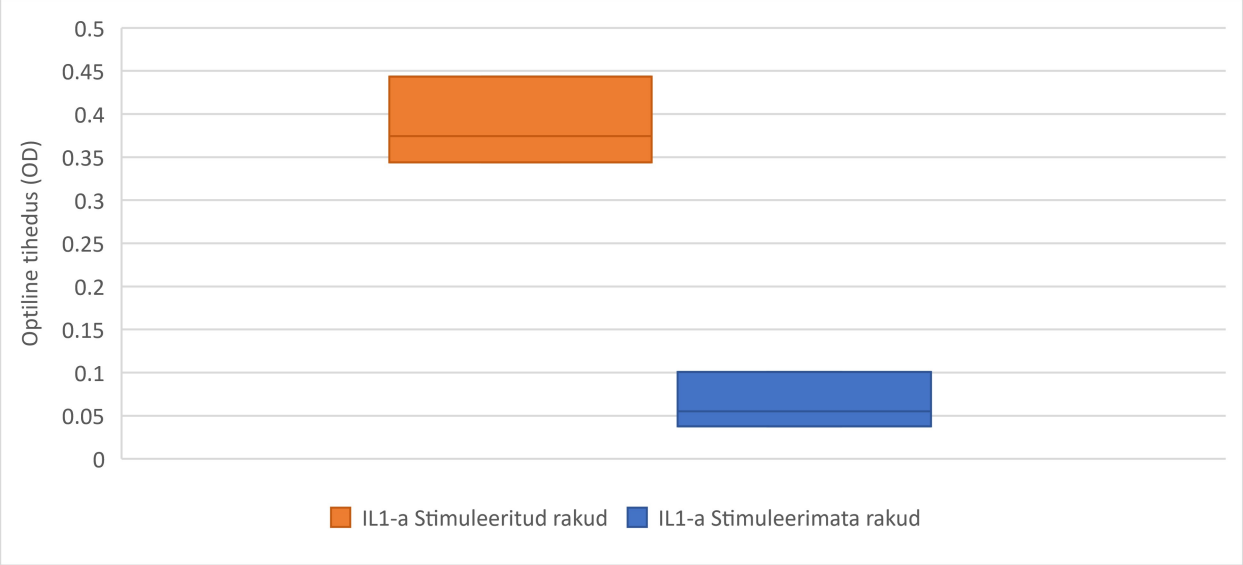


Joonis 4 IL1-α autoantikehade kogus TÜK Sisekliiniku, TÜK Nahahaiguste kliiniku ja COVID-19 läbipõdenute proovides. LIPS tulemusetest saadud suhe (SÜ) on pandud kümnendlogaritmi. Oranži joonega on kajastatud positiivsus-negatiivsus piir.

2.3.4. Neutraliseerimiskatsete tulemuste analüüs

Neutraliseerimisvõime testimisel sooviti näha, kas autoantikeha on võimeline IL1-α funktsiooni häirima. Katsete jaoks valiti NHDF rakuliin, sest see on võimeline reageerima IL1-α stimulatsioonile, mille mõjul hakkab see sekreteerima teisi tsütokiine nagu CXCL-8, mille tase on tavaolekus väga madal. ELISA analüüsi kaudu määrati CXCL-8 taset proovides.

Kõigepealt kontrolliti, kas NHDF rakuliin on IL1-α suhtes piisavalt tundlik, ning milline on CXCL-8 tase stimuleerimata rakkudes. Uurimiseks olid nullproovid, mis koguti rakkudelt, kuhu lisati ainult söödet ja positiivsed kontrollproovid, mis koguti plasmaga stimuleerimata rakkudelt, kuid kuhu oli lisatud IL1-α. Erinevust stimuleeritud ja stimuleerimata rakkude vahelt näeb Joonis 5.



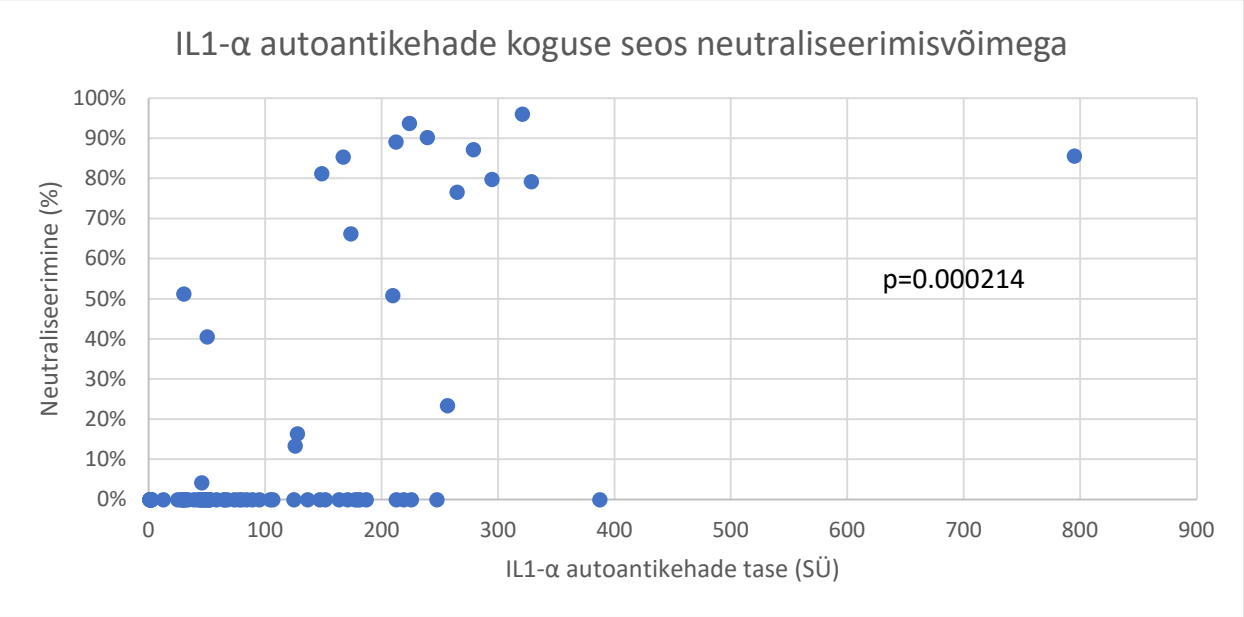
Joonis 5. CXCL-8 koguse erinevus IL1-α stimuleeritud rakkudes (+IL1-α) ja stimuleerimata (-IL1-α) rakkudes. Alumine joon viitab madalamale mõõdetud tulemusele ja ülemine kõrgemale mõõdetud tulemusele, keskel asuv joon näitab keskmist tulemust. Tulemused on 6 proovi optiliste väärtuste põhjal.

Esimese arvutusena oli vaja vabaneda taustast. See saavutati lahutades 540 nm tulemustelt 450 nm juurest mõõdetud tulemused. Seejärel leiti iga proovi OD keskmine. Kuna ELISA sooritati CXCL-8 kitiga, siis lahutati nullproovi keskmine OD tulemus kõikidest proovidest, sest see tulemus näitab rakkude CXCL-8 produktsiooni stimuleerimata olekus. IL1-α taseme määramiseks proovis jagati selle OD väärtust antigeeniga stimuleeritud rakkude OD-ga. Neutraliseerimise protsent leiti, kui lahutati tulemust ühega.

2.3.5. Kõrge IL1-α autoantikehade tase korreleerub neutraliseerimisvõimega

IL1-α autoantikehade neutraliseerimisvõime määramiseks vaadati TÜK Sisekliinikust, TÜK Nahahaiguste kliinikust ja KoroSero-EST-1 ja COVID-19 läbipõdenute valimist pärinevaid LIPS-positiivsetes plasmaproovides esinevate autoantikehade IL1-α neutraliseerimisvõimet (Joonis 6). Leiti, et positiivsetest proovidest (n=69) omasid IL1-α neutraliseerivat võimet 28% proovidest. Negatiivsetest kontrollproovidest (n=8) ei leitud ühelgi proovil neutraliseerivat aktiivsust.

LIPS ja ELISA testide tulemuste võrdlemiseks viidi läbi Pearsoni korrelatsioonianalüüs. P-väärtus, 0.000214 kinnitas, et tulemus on statistiliselt oluline. Seega saab väita, et inimestes, kellel esines kõrge IL1-α autoantikehade tase, omasid need autoantikehad tihtipeale võimet IL1-α bioloogilist aktiivsust takistada läbi seondumise ehk neutraliseerisid.



Joonis 6. TÜK Sisekliiniku, TÜK Nahahaiguste kliiniku, KoroSero-EST-1 ja COVID-19 läbipõdenute valimite seos IL1-α autoantikehade neutraliseerimise ja koguse vahel. Seos oli statistiliselt oluline p=0.000214.

2.3.6. COVID-19 haigestunute autoantikehad

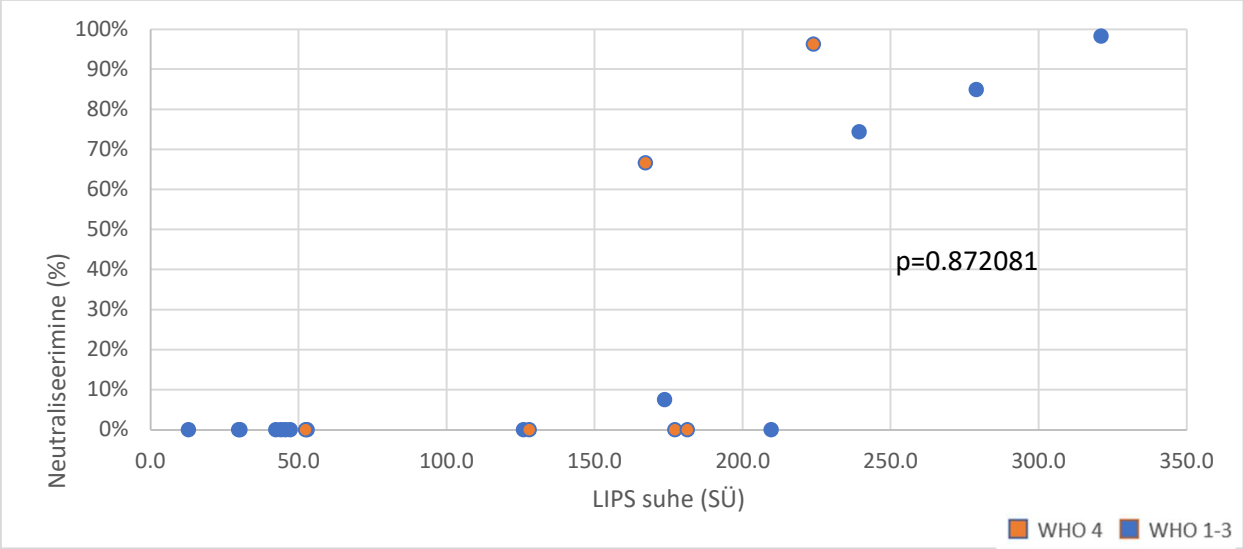
Antud töös analüüsiti ka COVID-19 läbipõdenud indiviide, kes olid jaotatud nelja gruppi nende haiguse raskusastme järgi (WHO 1-4). Määrati nende inimeste IL1-α autoantikehade hulk LIPS analüüsil. Tabelis 3. on kirjeldatud kui palju positiivseid proove leiti igast kategooriast ning kui suure protsendi nad proovide koguhulgast moodustasid. Leiti, et kriitilises seisus olnud patsientide

grupil (WHO 4) esineb kõrgem IL1-α autoantikehade kogus, kui gruppidel, mis põdes seda kergemalt (WHO 1-3). Tulemuste statistilise olulisuse kontrolliks viidi läbi χ^2-test, kus võrreldi WHO 4 positiivsete ja negatiivsete proovide arvu WHO gruppide 1-3 positiivsete ja negatiivsete proovidega. Testi tulemusena saadi teada, et p=0.039185, kinnitades, et COVID-19 raskusastmete IL1-α autoantikehade tasemete vahel oli erinevus.

Tabel 3. COVID-19 läbipõdenute positiivsete proovide osakaal igas WHO kategoorias. χ^2*-testiga nähti erinevust WHO 4 ja WHO 1-3 kuuluvate patsientide vahel (p=0.039185).*

	WHO 0	WHO 1	WHO 2	WHO 3	WHO 4
Positiivsed proovid	9	2	9	5	6
Negatiivsed proovid	40	14	32	31	14
Positiivsete proovide prot-sent	18%	12.5%	22%	14%	30%

COVID-19 läbipõdenute valimis vaadati 17 proovi neutraliseerimisvõimet, mis pärinesid WHO 1-4 grupist. Vaadates WHO 4. gruppi kuuluvate autoantikehade neutraliseerimisvõimet ja võrreldes seda proovidega, mis kuulusid WHO gruppidesse 1-3 ei leitud χ^2-testiga statistiliselt olulisi erinevusi nende vahel (p=0.872081) (Joonis 7).



Joonis 7. IL1-α autoantikehade kogus ja nende neutraliseerimisvõime COVID-19 läbipõdenutel. Ei leitud statistiliselt olulist seost haiguse raskuse ja põdemise vahel (p=0.872081).

2.4 Arutelu

IL1-α on põletikku tekitav tsütokiin. Seondudes oma retseptoriga annab ta edasi signaali, mille mõjul hakkab rakk hakata tootma teisi tsütokiine, mis kutsuvad kohale immuunsüsteemi rakud ning algavad põletikureaktsioonid. IL1-α autoantikehad on võimelised ära tundma ja siduma IL1-α , takistades nii selle seondumist retseptoriga, mille tõttu toimub hilisem või nõrgem põletikuvastus (Schett et al., 2016). Põletik on keha kaitsemehhanism paljude haigustekitajatele, kuid kui see kestab liiga kaua võib see viia koevigastusteni (Medzhitov, 2010).

Antud töös sooritati LIPS meetodil test, et määrata ära IL1-α autoantikehade tase kogutud plasmadest, proovid pärinesid KoroSero-EST-1 uuringust, TÜK Sisekliinikust, TÜK Nahahaiguste kliinikut. Meetodit on varasemalt kasutatud tüüp I IFN vastaste autoantikehade taseme määramiseks (Bastard et al., 2020). Meetod on hästi korratav, siin uuringus oli päevade vaheline varieeruvus väike.

LIPS meetodil leitud proovide IL1-α autoantikehade taseme viidi kokku proovi andnud isiku vanusega, sest sooviti näha, kas esineb seos IL1-α autoantikehade ja vanuse vahel. Seose uurimiseks kasutati tavapopulatsiooni läbilõike proove. Varasemalt on näidatud, et vanuse kasvades tõuseb autoantikehade tase ka tervetes inimestes (Manoussakis et al., 1987). Seda seetõttu, et immuunrakkudel on olnud pikaaegseid kontakte autoantigeenidega (Wick et al., 2003). Antud uuringus kasutati (Orimo et al., 2006) eakate definitsiooni, jagades indiviidid alla 65 ja üle 65-aastasteks.

Täheldati, et üle 65-aastaste grupis oli IL1-α autoantikeha positiivseid indiviide 7% ja alla 65-aastaste grupis 5%. χ^2-test näitas, et antud erinevus polnud statistiliselt oluline ($p>0.05$). Kuigi antud uuringus ei olnud näha IL1-α autoantikehade taseme erinevusi nende kahe vanusegrupi vahel (n=176), siis suurema valimi korral võiksid erinevused olla siiski statistiliselt olulised.

Uuriti ka TÜK Sisekliiniku ja TÜK Nahahaiguste kliinikust pärinevaid plasmasid, mis pärinesid ainult vanuritest. Tegu oli erinevaid haigusi põdevate inimestega, seega ei saa välistada, et nendes on üldine põletikutase kõrgem. On kirjeldatud, et sellistel juhtudel esineb rohkem rakkude nekroosi, nii et vabaneb IL1-α ja pideva kontakti tõttu saavad välja areneda selle vastased antikehad (Dinarello, 2011). Seega antud töös ei ole võimalik hinnata, kas nendel on IL1-α autoantikehade tase kõrge vanuse või kaasuvate haiguse tõttu.

Järgmiseks pandi paika, millistes proovides esines kõrge IL1-α autoantikehade tase, selleks leiti üldpopulatsiooni LIPS suhete keskmise ja SD abil positiivsus-negatiivsus piir. Valimite võrdlemisel oli näha, et TÜK Sisekliinikust ja TÜK Nahahaiguste kliinikust olid positiivsed 14%. Veelgi enam positiivseid leidus COVID-19 läbipõdenute valimist, kus positiivseid oli lausa 19%. Mõlemad väärtused on kõrgemad kui tavapopulatsiooni esindajate hulgas, kus kõrge tase oli kõigest 7% proovidest. Autoantikehade tõusu on kirjeldatud mitmete haiguste puhul, näiteks autoimmuunhaiguste (Suzuki et al., 1991), vähi (Zaenker et al., 2016) ja COVID-19 puhul (Wang et al., 2021). Kui haigusega kaasneb põletik, siis tsütokiinide vastaste autoantikehade abil saab keha reguleerida selle reaktsiooni tugevust. See võib seletada, miks TÜK kliinikutest ja COVID-19 läbipõdenutes pärit valimites esinesid kõrgemad IL1-α vastased autoantikehad kui tavapopulatsioonis.

Lisaks autoantikehade taseme määramisele sooritati katseid, et uurida nende neutraliseerimisvõimet. Positiivsete proovide hulgast valiti kõrge IL1-α autoantikehade tasemega proovid. Nendega viidi läbi rakkude stimuleerimine, kust koguti supernatant, mida kasutati ELISA analüüsil. Katsetes mõõdetud optilise tiheduse järgi leiti, kas esineb neutraliseeriv aktiivsust, mid omakorda võrreldi autoantikehade kogusega. Nähti, et kõrgematel IL1-α autoantikehade tasemel esines neutraliseerimisvõimet rohkem kui madalamatel tasemetel ning seda seost kinnitati statistilise testiga ($p<0.05$). Võib oletada, et nendes patsientides on IL1-α autoantikehade neutraliseerivavõime tõttu põletikuvastuse teke häiritud (Dinarello et al., 2012). Põletikureaktsiooni mahasurumine võib vähendada patsiendi sümptomeid ja kaitseb nende kudesid, eriti kui tegu on autoimmuunhaigustega (Miossec, 2002). Häiritud immuunvastusel on ka omad negatiivsed küljed, nagu nähti neutraliseerivate tüüp I IFN autoantikehadega. Patsientides, kellel esinesid kõrged tasemed neid autoantikehi oli suurem risk vajada COVID-19 haigestumisel haiglaravi, sest ei saanud toimuda immuunsüsteemis viirusvastust (Bastard et al., 2020).

2020. aastal algas viiruse SARS-CoV-2 põhjustatud pandeemia, inimestes põhjustab see viirus haigust COVID-19. Kuigi enamik nakatunutest põevad selle läbi kergelt on teatud osal rahvastikust risk nakatuda sellesse raskelt, mis võib lõppeda surmaga (Williamson et al., 2020). Siia töösse oli kaasatud 113 erineva raskusastmega COVID-19 läbipõdenud patsienti.

COVID-19 nakkuse puhul on tihti surma põhjuseks haiguse jooksul välja kujunenud elundipuudulikkus, mille võis tekitada patsiendi liiga tugev immuunvastus viirusele (Del Valle et al., 2020; Mokhtari et al., 2020). Näiteks IL-6 kõrgemad tasemed esinevad just COVID-19 raskelt

põdevates patsientides ja tekkinud põletik kahjustab nende kudesid (Wu et al., 2021). Samas ilma immuunvastuseta ei saaks toimuda viirusest paranemist, põletiku abil immuunsüsteem takistab viiruse levikut. Eriti olulist rolli mängivad siin B-rakud, mis on toodavad viirusvastaseid antikehi, mida on vaja et viirus kehast eemalda (Medzhitov, 2010). Seega on paranemise seisukohalt oluline, et immuunvastus oleks hästi reguleeritud. Üks viis kuidas keha saab vältida liiga tugevat põletikuvastust on autoantikehade kaudu. Eelnevalt on kirjeldatud, et COVID-19 patsientides on mitmete autoantikehade tase kõrgem võrreldes tervete kontrollidega, seda eriti just tsütokiinide vastaste autoantikehade hulgas (Wang et al., 2021).

Antud uuringus kinnitati, et COVID-19 läbipõdenute grupis oli IL1-α autoantikehade tase kõrgem (19%) kui tavapopulatsioonil (7%) ($p<0.05$). Lisaks vaadati, IL1-α autoantikehade taseme erinevusi erinevatel haiguseraskusastmetel. Kriitilises seisus olnud patsientide IL1-α autoantikehade tase oli kõrgem kui teistes gruppides ning saadud tulemus oli statistiliselt oluline. Erinevate COVID-19 raskusastmete vahel ei tuvastatud neutraliseerimisvõime statistiliselt olulisi erinevusi. Kuid kindlat järeldust on raske tõmmata, sest uuritavate proovide arv ($n=17$) on väga väike. Kuna töös on kasutatud vaid ühe ajahetke plasmaproovi, siis kui jätkata IL1-α autoantikehade tasemete uurimisega COVID-19 patsientides võiks koguda proove mitmes ajapunktis, et vaadata, kas autoantikehade tootmine ning neutraliseerimisvõime on mõjutatud nakkusest.

Selle tööga pole võimalik tuvastada, kas kõrge kriitilises grupis olevatel patsientidel oli IL1-α autoantikehade kõrge tase enne nakatumist või tekkisid need autoantikehad vastusena tugevale põletikule. Kui tase oli kõrge juba enne, siis oleks võimalik tuua paralleele tüüp I IFN autoantikehadega (Bastard et al., 2020).

Sarnaselt IL1-α autoantikehadega saab IL1-α mõju vähendada IL1-α retseptorit blokeeriva ravimi abil. See aitab takistada ägedat põletikuvastust ja seeläbi saab vältida elundipuudulikkust ning see vähendab nendes patsientides suremust (Kyriazopoulou et al., 2021). Kuid tuleb arvestada, et immuunsüsteemi piiramise tõttu, ei teki neil nii efektiivseid antikehi viiruse vastu, mistõttu vajavad nad pikemat haiglaravi, häiritud immuunsüsteem tõstab teistesse haigustesse nakatumise riski ja neil tekib vähem viirust neutraliseerivaid antikehi suurendades kordusnakkuse võimalust (Della-Torre et al., 2021). Nende riskide tõttu on seda ravimit lubatud kasutada vaid raskelt ja kriitilistelt põdevatel COVID-19 patsientidel (EMA, 2021).

Käesolevas töös uuriti IL1-α autoantikehasid nende esinemissagedust ja neutraliseerimisvõimet. Kaasatud oli 4 erinevat valimit, milleks olid tavapopulatsiooni esindajad, TÜK Sisekliiniku ja TÜK Nahahaiguste kliiniku patsiendid ning COVID-19 läbipõdenud. Leiti, et esinevad erinevused IL1- α autoantikehade tasemetes valimite vahel. Tuvastati ka seos kõrge IL1-α autoantikehade taseme ja nende neutraliseerimisvõime vahel. Saadud töös on pandud algus mitmetele küsimustele, mis kindlasti vajaks edasi uurimist.

KOKKUVÕTE

Antikehad võivad reageerida molekulidega, mis pärinevad kehast endast, sellel juhul nimetatakse neid autoantikehadeks. Üheks autoantigeeniks, mille funktsiooni nad häirida saavad, on tsütokiinid. Nende roll kehas on vahendada rakkudele signaale ja need on olulised immuunsüsteemi reaktsiooni alustamiseks. Nende hulgas on tsütokiin IL1-α, mille signaali tõttu hakkavad rakud sekreteerima teisi tsütokiine, mida on vaja põletiku tekitamiseks. Autoantikehad IL1-α vastu, saavad seeläbi takistada põletikureaktsiooni teket. Sellel on nähtud positiivset mõju autoimmuunhaiguste korral, aga selle roll on ebaselge nakkushaiguste nagu COVID-19 puhul, kus normaalne immuunvastus on viirusest taastumiseks oluline.

Selles bakalaureusetöös uuriti IL1-α vastaseid autoantikehi. LIPS analüüsiga määrati nende tase erinevates valimites ja sellest selgus, et kõrge tase esines 7% tavapopulatsiooni läbilõikest, kliinikumist pärit proovidel oli see 14% ning COVID-19 läbipõdenutel 19% proovidest. Nende positiivsete proovide hulgast valiti välja proovid, millega sooritati ELISA analüüs, et vaadata nende autoantikehade neutraliseerivat aktiivsust.

Tulemuste analüüsist selgus, et IL1-α autoantikehade kogus ei sõltu vanusest, vaid taseme tõusu mõjutavad erinevad haigused, nende hulgas COVID-19. Kõrge sekretsiooniga patsientidel tuvastati rohkem neutraliseerivat aktiivust. Patsiendid, kes põdesid haigust COVID-19, olid jagatud nende haigusraskuse järgi ning kriitilises seisus patsientidel tuvastati kõrgemaid IL1-α autoantikehade tasemed kui teistesse gruppidesse kuuluvatel inimestel, kuid pole teada, kas nende IL1-α autoantikehade tase on tingitud COVID-19 nakkusest või olid juba eelnevalt olemas. Nende neutraliseeriva aktiivsuse hulgas ei leitud gruppide vahel erinevusi.

Autoantibodies against interleukin 1-alpha: frequency and potential biological role

Tuuliki Pomerants

SUMMARY

Antibodies against the body's own molecules are called autoantibodies. Low amounts are normal in healthy persons, however change in their expression levels can be caused by age or diseases. Cytokines are signal molecules needed by cells for many processes including mediating the immune response. Interleukin 1-alpha is a pro-inflammatory cytokine and one of the first that is released when a cell is damaged. Following the release it binds to a receptor, which triggers changes within the cell and causes the release of other pro-inflammatory cytokines among others CXCL-8 and IL-6. This process starts the immune response. Stopping inflammation can have its benefits for a patient that suffers from autoimmune conditions, from which chronic inflammation damages tissues and organs and causes symptoms. In the case of infections stopping inflammation can prevent organ damage, but a late immune response might also lead to a more severe course of illness. The goals in this study were to measure IL1-α autoantibody levels in different populations and to see which factors contribute to their expression. Another aspect that was studied was the autoantibodies ability to neutralize cytokine IL1-α.When looking at expression levels it was found that normal population had lower levels of IL1-α autoantibodies when compared to different patient groups. But no correlation was seen between the age and IL1-α levels. IL1-α autoantibody expression was studied in different populations, high levels were counted as positive. Within the normal population 7% were determined as positive in comparison to 14% in samples collected from clinics and 19% of samples in COVID-19 patient group. From those positive samples the ones with highest score were selected and their neutralizing ability was analyzed. Sample plasma was used to stimulate NHDF cells. ELISA analysis was done using supernatant collected from the cells. It was found that high levels of IL1-α autoantibodies usually correlate with neutralizing ability. Patients with COVID-19 were separated into groups based on their disease severity. It was found that IL1-α autoantibody levels were the highest in critically ill patients. When looking at the disease groups ability to neutralize no difference was found. This may be due to the low levels of samples used and it is unknown whether the autoantibodies were there before the disease or were triggered by COVID-19 therefore further research is needed.

ALLIKAD

Kirjanduse loetelu

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Shiv Pillai. (2014). *Cellular and molecular immunology* (8th ed.). Saunders. p. 184-189.

Alimohamadi, Y., Sepandi, M., Taghdir, M., & Hosamirudsari, H. (2020). Determine the most common clinical symptoms in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, *61*(3), E304–E312. https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.3.1530

Avrameas, S., Alexopoulos, H., & Moutsopoulos, H. M. (2018). Natural Autoantibodies: An Undersugn Hero of the Immune System and Autoimmune Disorders—A Point of View. *Frontiers in Immunology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01320

Bastard, P., Rosen, L. B., Zhang, Q., … Casanova, J.-L. (2020). Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science (New York, N.Y.)*, *370*(6515), eabd4585. PubMed. https://doi.org/10.1126/science.abd4585

Boes, M., Schmidt, T., Linkemann, K., Beaudette, B. C., Marshak-Rothstein, A., & Chen, J. (2000). Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(3), 1184–1189. PubMed. https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.1184

Cambier, J. C., Gauld, S. B., Merrell, K. T., & Vilen, B. J. (2007). B-cell anergy: From transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nature Reviews Immunology*, *7*(8), 633–643. https://doi.org/10.1038/nri2133

D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, *43*(6), 582–592. https://doi.org/10.1002/cbin.11137

Del Valle, D. M., Kim-Schulze, S., Huang, H.-H., … Gnjatic, S. (2020). An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nature Medicine*, *26*(10), 1636–1643. https://doi.org/10.1038/s41591-020-1051-9

Della-Torre, E., Criscuolo, E., Lanzillotta, M., Locatelli, M., Clementi, N., Mancini, N., & Dagna, L. (2021). IL-1 and IL-6 inhibition affects the neutralising activity of anti-SARS-CoV-2 antibodies in patients with COVID-19. *The Lancet Rheumatology*, *3*(12), e829–e831. https://doi.org/10.1016/S2665-9913(21)00321-0

Dinarello, C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, *117*(14), 3720–3732. https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-273417

Dinarello, C. A., Simon, A., & van der Meer, J. W. M. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, *11*(8), 633–652. https://doi.org/10.1038/nrd3800

Elkon, K., & Casali, P. (2008). Nature and functions of autoantibodies. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*, *4*(9), 491–498. PubMed. https://doi.org/10.1038/ncprheum0895

Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S., & Girardin, S. E. (2007). Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clinical and Experimental Immunology*, *147*(2), 227–235. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x

Forthal, D. N. (2014). Functions of Antibodies. *Microbiology Spectrum*, *2*(4), 1–17.

Foster, J. R. (2001). The functions of cytokines and their uses in toxicology. *International Journal of Experimental Pathology*, *82*(3), 171–192. PubMed. https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2001.iep0082-0171-x

Freire, M. O., & Van Dyke, T. E. (2013). Natural resolution of inflammation. *Periodontology 2000*, *63*(1), 149–164. https://doi.org/10.1111/prd.12034

Ha, H., Debnath, B., & Neamati, N. (2017). Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics*, *7*(6), 1543–1588. PubMed. https://doi.org/10.7150/thno.15625

Janeway CA Jr, Travers P, & Walport M. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* (5th edition). Garland Science.

Jiang, W. G., Sanders, A. J., Ruge, F., & Harding, K. G. (2012). Influence of interleukin-8 (IL-8) and IL-8 receptors on the migration of human keratinocytes, the role of PLC-γ and potential clinical implications. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *3*(2), 231–236. PubMed. https://doi.org/10.3892/etm.2011.402

Jouvenne, P., Fossiez, F., Banchereau, J., & Miossec, P. (1997). High Levels of Neutralizing Autoantibodies Against IL-1α are Associated with a Better Prognosis in Chronic Polyarthritis: A Follow-Up Study. *Scandinavian Journal of Immunology*, *46*(4), 413–418. https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1997.d01-139.x

Justiz Vaillant, A. A., & Qurie, A. (2022). Interleukin. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Koçak, H., Oner-Iyidoğan, Y., Koçak, T., & Oner, P. (2004). Determination of diagnostic and prognostic values of urinary interleukin-8, tumor necrosis factor-alpha, and leukocyte arylsulfatase-A activity in patients with bladder cancer. *Clinical Biochemistry*, *37*(8), 673–678. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.02.005

Kyriazopoulou, E., Huet, T., Cavalli, G., Gori, A., Kyprianou, M., Pickkers, P., Eugen-Olsen, J., Clerici, M., Veas, F., Chatellier, G., Kaplanski, G., Netea, M. G., Pontali, E., Gattorno, M., Cauchois, R., Kooistra, E., Kox, M., Bandera, A., Beaussier, H., … Selmi, C. (2021). Effect of anakinra on mortality in patients with COVID-19: A systematic review and patient-level meta-analysis. *The Lancet Rheumatology*, *3*(10), e690–e697. https://doi.org/10.1016/S2665-9913(21)00216-2

Ludwig, R. J., Vanhoorelbeke, K., Leypoldt, F., Kaya, Z., Bieber, K., … Nimmerjahn, F. (2017). Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. *Frontiers in Immunology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00603

Malik, A., & Kanneganti, T.-D. (2018). Function and regulation of IL-1α in inflammatory diseases and cancer. *Immunological Reviews*, *281*(1), 124–137. https://doi.org/10.1111/imr.12615

Mannoor, K., Xu, Y., & Chen, C. (2013). Natural autoantibodies and associated B cells in immunity and autoimmunity. *Autoimmunity*, *46*(2), 138–147. https://doi.org/10.3109/08916934.2012.748753

Manoussakis, M. N., Tzioufas, A. G., Silis, M. P., Pange, P. J., Goudevenos, J., & Moutsopoulos, H. M. (1987). High prevalence of anti-cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population. *Clinical and Experimental Immunology*, *69*(3), 557–565. PubMed.

Mantovani, A., Dinarello, C. A., Molgora, M., & Garlanda, C. (2019). Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*, *50*(4), 778–795. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.012

Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, *140*(6), 771–776. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006

Miossec, P. (2002). Anti-interleukin 1α autoantibodies. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *61*(7), 577. https://doi.org/10.1136/ard.61.7.577

Mokhtari, T., Hassani, F., Ghaffari, N., Ebrahimi, B., Yarahmadi, A., & Hassanzadeh, G. (2020). COVID-19 and multiorgan failure: A narrative review on potential mechanisms. *Journal of Molecular Histology*, *51*(6), 613–628. https://doi.org/10.1007/s10735-020-09915-3

Nagant, C., Ponthieux, F., Smet, J., Dauby, N., Doyen, V., Besse-Hammer, T., Bels, D. D., Maillart, E., & Corazza, F. (2020). A score combining early detection of cytokines

accurately predicts COVID-19 severity and intensive care unit transfer. *International Journal of Infectious Diseases*, *101*, 342–345. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.003

Orimo, H., Ito, H., Suzuki, T., Araki, A., Hosoi, T., & Sawabe, M. (2006). Reviewing the definition of "elderly." *Geriatrics & Gerontology International*, *6*(3), 149–158. https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2006.00341.x

Qazi, B. S., Tang, K., & Qazi, A. (2011). Recent Advances in Underlying Pathologies Provide Insight into Interleukin-8 Expression-Mediated Inflammation and Angiogenesis. *International Journal of Inflammation*, *2011*, 908468. https://doi.org/10.4061/2011/908468

Reverberi, R., & Reverberi, L. (2007). Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfusion = Trasfusione Del Sangue*, *5*(4), 227–240. PubMed. https://doi.org/10.2450/2007.0047-07

Russo, R. C., Garcia, C. C., Teixeira, M. M., & Amaral, F. A. (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*, *10*(5), 593–619. https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.894886

Saper, C. B. (2009). A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, *57*(1), 1–5. https://doi.org/10.1369/jhc.2008.952770

Schett, G., Dayer, J.-M., & Manger, B. (2016). Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*, *12*(1), 14–24. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.166

Schroeder, H. W., Jr, & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 Suppl 2), S41–S52. PubMed. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046

Shahzad, A., Knapp, M., Lang, I., & Köhler, G. (2010). Interleukin 8 (IL-8)—A universal biomarker? *International Archives of Medicine*, *3*, 11–11. PubMed. https://doi.org/10.1186/1755-7682-3-11

Suzuki, H., Ayabe, T., Kamimura, J., & Kashiwagi, H. (1991). Anti-IL-lα autoantibodies in patients with rheumatic diseases and in healthy subjects. *Clinical & Experimental Immunology*, *85*(3), 407–412.

Svenson, M., Poulsen, L. K., Fomsgaard, A., & Bendtzen, K. (1989). IgG Autoantibodies against Interleukin 1α in Sera of Normal Individuals. *Scandinavian Journal of Immunology*, *29*(4), 489–492. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1989.tb01149.x

Wahid Ali Khan. (2019). Introductory Chapter: Autoantibodies and Their Types. In *Autoantibodies and Cytokines* (p. Ch. 1). IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.77328

Wang, E. Y., Mao, T., Klein, J., … Yale IMPACT Team. (2021). Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. *Nature*, *595*(7866), 283–288. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03631-y

Weber, A., Wasiliew, P., & Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Science Signaling*, *3*(105), cm1–cm1. https://doi.org/10.1126/scisignal.3105cm1

Wick, G., Berger, P., Jansen-Dürr, P., & Grubeck-Loebenstein, B. (2003). A Darwinian-evolutionary concept of age-related diseases. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Neurobiology and Neuroendocrinology of Aging*, *38*(1), 13–25. https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00161-4

Williamson, E. J., Walker, A. J., Bhaskaran, K., … Goldacre, B. (2020). Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature*, *584*(7821), 430–436. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2521-4

Wu, J., Shen, J., Han, Y., Qiao, Q., … Xia, X. (2021). Upregulated IL-6 Indicates a Poor COVID-19 Prognosis: A Call for Tocilizumab and Convalescent Plasma Treatment. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.598799

Zaenker, P., Gray, E. S., & Ziman, M. R. (2016). Autoantibody Production in Cancer—The Humoral Immune Response toward Autologous Antigens in Cancer Patients. *Autoimmunity Reviews*, *15*(5), 477–483. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.01.017

Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International Anesthesiology Clinics*, *45*(2), 27–37. PubMed. https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e

Zhang, R., Li, Y., Zhang, A. L., Wang, Y., & Molina, M. J. (2020). Identifying airborne transmission as the dominant route for the spread of COVID-19. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(26), 14857–14863. https://doi.org/10.1073/pnas.2009637117

Kasutatud veebiallikad

Antibody. (n.d.). In *Encyclopedia Britannica*. https://www.britannica.com/facts/antibody (7.03.2022)

EMA. (2021, December 16). *EMA recommends approval for use of Kineret in adults with COVID-19*. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommends-approval-use-kineret-adults-covid-19 (3.05.2022)

Living guidance for clinical management of COVID-19. (2021). World Health Organization. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/349321/WHO-2019-nCoV-clinical-2021.2-eng.pdf (16.04.2022)

WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. (n.d.). Retrieved May 24, 2022, from https://covid19.who.int (11.03.2021)

Lihtlitsents

Mina, Tuuliki Pomerants

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose, Inimese interleukiin 1-alfa vastased autoantikehad: esinemissagedus ja võimalik bioloogiline roll

mille juhendajad on Liina Tserel PhD ja Tõnis Org PhD

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 Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, 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.

Tuuliki Pomerants

24.05.2022