

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Тамара Н. Ђукић

Стандардизација фотон корелационе  
спектроскопије као методе за одређивање  
величине имунокомплекса у дијагностичке  
сврхе

докторска дисертација

Београд, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Tamara N. Đukić

Standardization of photon correlation spectroscopy  
as a method for determining the size of  
immunocomplexes for diagnostic purposes

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

Ментори:

---

др Верица Ђорђевић, доцент  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

др Весна Илић, научни саветник  
Универзитет у Београду, Институт за медицинска  
истраживања, Институт од националног значаја за  
Републику Србију

Чланови комисије:

---

др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

др Соња Јаковетић Танасковић, доцент  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

др Ивана Дрвеница, виши научни сарадник  
Универзитет у Београду, Институт за медицинска  
истраживања, Институт од националног значаја за  
Републику Србију

---

др Маријана Ковачић, научни сарадник  
Универзитет у Београду, Институт за медицинска  
истраживања, Институт од националног значаја за  
Републику Србију

Датум одбране: \_\_\_\_\_

*Ова докторска дисертација урађена је у сарадњи две институције, Технолошко-металуришког факултета, Универзитета у Београду и Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду у оквиру истраживања које финансира Министарство науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије.*

*Експериментални део рада ове докторске дисертације је највећим делом изведен у лабораторијама Технолошко-металуришког факултета, Универзитета у Београду и Института за медицинска истраживања. Део експеримената је урађен у другим, или уз помоћ других научно истраживачких организација у Србији: Института за реуматологију (сакупљање серума и анализа медицинске документације особа са реуматоидним артритисом), Стоматолошког факултета Универзитета у Београду (сакупљање серума здравих особа), Института за трансфузиологију и хемобиологију Војномедицинске академије у Београду (сакупљање серума периферне крви 300 добровољних давалаца крви), Пољопривредног факултета Универзитета у Београду (сушење узорака за SEM анализу), Института за физику Универзитета у Београду (AFM анализа) и Института за трансфузију крви Србије (имунонефелометријска анализа).*

*У експерименталном делу рада учествовали су:*

*Тамара Ђукић, Иновациони центар Технолошко-металуришког факултета*

*др Ивана Дрвеница, др Маријана Ковачић, др Слаћан Милановић, др Рајна Минић, др Соња Мојсиловић и др Весна Илић, Институт за медицинска истраживања, Универзитета у Београду.*

*Др Борислав Васић, Институт за физику Универзитета у Београду*

*Тамара Матић, мастер инжењер, Технолошко-металуришки факултет Универзитета у Београду*

*Др Стева Левић, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду*

*Др Оливера Савић, Институт за трансфузију крви Србије*

## *Захвалница*

# Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе

## Сажетак

У овој докторској дисертацији испитана је примена фотон корелационе спектроскопије за одређивање величине колоидних честица имунокомплекса у дијагностичке сврхе.

Након потврде да је фотон корелационом спектроскопијом могуће анализирати величину тј. хидродинамички пречник колоидних честица у *in vitro* формираним имунокомплексима, овом методом је анализирана величина честица у циркулишућим имунокомплексима (СИС) 30 особа са реуматоидним артритисом (РА) и 30 здравих особа. И у контролним СИС узорцима и СИС узорцима особа са РА је на основу величине детектовано 50 типова честица. За СИС узорке особа са РА је, у односу на контролу, била карактеристична значајно већа заступљеност честица пречника 28,2, 531, 712 и 1718 nm и мања заступљеност честице пречника 78,8 nm. Промене у нивоу садржаја имуноглобулина у СИС узорцима особа са РА се нису подударале са обрасцем расподеле величина детектованих честица. Значајно повећан ниво IgA у СИС узорцима особа са РА у поређењу са контролом је повезан са 28 типова честица. Значајно повишен ниво укупних IgG у СИС узорцима особа са РА је повезан са честицама пречника 7,5, 18,2, 21,0, 24,0, 220, 396, 712, и 812 nm, а повећан ниво IgM је повезан са честицама пречника 32,7, 43,8, 220, 396, 531 и 1281 nm. Истовремено повећање нивоа све три класе имуноглобулина у СИС узорцима особа са РА, у поређењу са контролом, показано је само у СИС узорцима који садрже честице од 220 и 396 nm.

Добијени резултати су показали да се фотон корелационом спектроскопијом може одредити величина колоидних честица у СИС у физиолошким и патолошким стањима и ти подаци би се, након потврде у студијама већег обима, могли користити за дијагнозу, праћење прогресије болести и тестирање ефикасности терапијских протокола болести у чију патогенезу су укључени имунокомплекси.

**Кључне речи:** *фотон корелациона спектроскопија; имуноглобулини; циркулишући имунокомплекси; реуматоидни артритис;*

**Научна област:** Технолошко инжењерство

**Ужа научна област:** Биохемијско инжењерство и биотехнологија

# **Standardization of photon correlation spectroscopy as a method for determining the size of immunocomplexes for diagnostic purposes**

## **Abstract**

This doctoral dissertation investigates the application of photon correlation spectroscopy (PCS) for determining the size of colloidal particles in immune complexes in diagnostic.

After validating PCS as a method for analyzing the hydrodynamic diameter of the particles *in vitro*-formed immune complexes, it was applied to study the particle size in circulating immune complexes (CICs) from 30 individuals with rheumatoid arthritis (RA) and 30 healthy controls. In both control and RA CIC samples, 50 distinct particle size types were identified. Notably, CICs from individuals with RA exhibited a significantly higher prevalence of particles with diameters of 28,2, 531, 712, and 1718 nm, and a lower prevalence of particles with a diameter of 78,8 nm, compared to controls. This particle distribution pattern did not reflect the changes in the CIC immunoglobulin level. A marked increase in IgA levels in RA CIC samples was associated with 28 particle types. Furthermore, elevated total IgG levels in RA CIC samples were linked to particles with diameters of 7,5, 18,2, 21, 24, 220, 396, 712, and 812 nm, while increased IgM levels corresponded to particles with diameters of 32,7, 43,8, 220, 396, 531, and 1281 nm. Concurrent elevations in all three immunoglobulin classes were observed only in CIC samples containing particles of 220 and 396 nm.

These findings demonstrate that PCS is capable of accurately determining the size distribution of colloidal particles in CICs under both physiological and pathological conditions. With further validation in larger studies, this method could be employed for diagnostic purposes, monitoring disease progression, and evaluating the effectiveness of therapeutic interventions in diseases where immune complexes play a key role in pathogenesis.

**Key words:** *photon correlation spectroscopy; immunoglobulins; circulating immune complexes; rheumatoid arthritis;*

**Scientific field:** Technological engineering

**Scientific discipline:** Biochemical engineering and biotechnology

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	1
<b>2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО</b>	
2.1. Имунокомплекси.....	3
2.1.1. Имуноглобулини.....	3
2.1.2. Структура и функција имунокомплекса.....	7
2.1.3. Болести посредоване имунокомплексима – доказивање, квантификација и изоловање имунокомплекса.....	10
2.1.3.1. Аутоантитела и имунокомплекси у реуматоидном артритису.....	11
2.1.4. Методе које се у научним истраживањима примењују за анализу величине имунокомплекса.....	13
2.2. Фотон корелациона спектроскопија.....	17
2.2.1. Историјат развоја.....	17
2.2.2. Принципи фотон корелационе спектроскопије.....	18
2.2.3. Математички модели који се примењују у анализи резултата фотон корелационе спектроскопије.....	21
2.2.4. Примена у фармацеутским и биотехнолошким истраживањима.....	22
2.2.5. Примена фотон корелационе спектроскопије у дијагностичке сврхе.....	24
2.2.6. Фактори који утичу на резултат мерења фотон корелационом спектроскопијом.....	25
2.2.7. Предности фотон корелационе спектроскопије у анализи величина имунокомплекса.....	26
<b>3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	28
<b>4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО</b> .....	31
4.1. Материјал.....	31
4.1.1. Серуми периферне крви здравих добровољних давалаца крви.....	31
4.1.2. Серуми периферне крви особа са РА и здравих особа.....	31
4.1.3. Албумин.....	32
4.2. Методе.....	32
4.2.1. Изоловање крвног серума.....	32
4.2.2. Изоловање IgG из серума афинитетном хроматографијом.....	32
4.2.3. Одређивање концентрације протеина.....	32
4.2.4. Електрофореза протеина у гелу полиакриламида са додатком натријум-додецил-сулфата.....	33
4.2.5. Формирање агрегата протеина топлотом.....	33
4.2.5.1. Агрегација албумина топлотом.....	33
4.2.5.2. Агрегација IgG топлотом - Формирање <i>in vitro</i> аналога имунокомплекса.....	33
4.2.6. <i>In vitro</i> формирање имунокомплекса.....	33
4.2.7. Изолација С1С из серума здравих особа и серума особа са РА.....	34
4.2.8. Одређивање концентрације имуноглобулина	



имунонефелометријском методом.....	34
4.2.9. Дот блот анализа.....	34
4.2.10. Одређивање величине честица фотон корелационом спектроскопијом.....	35
4.2.11. Мерење $\zeta$ потенцијала.....	35
4.2.12. Гел филтрација.....	36
4.2.13. Ултрацентрифугирање на градијенту сахарозе.....	36
4.2.14. Скенирајућа електронска микроскопија.....	36
4.2.15. Микроскопија атомских сила.....	37
4.2.16. Математичка обрада резултата.....	37
4.2.17. Статистичка анализа.....	37
<b>5. РЕУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>38</b>
5.1. Анализа величине и структуре <i>in vitro</i> формираних агрегата албумина и имуноглобулина и <i>in vitro</i> формираних имунокомплекса.....	38
5.1.1. Анализа величине и структуре <i>in vitro</i> формираних агрегата албумина.....	39
5.1.1.1. Агрегација албумина топлотом.....	39
5.1.1.2. Анализа величине нативног албумина и албумина агрегираног топлотом фотон корелационом спектроскопијом.....	40
5.1.1.3. Анализа величине нативног албумина и албумина агрегираног топлотом ултрацентрифугирањем.....	42
5.1.1.4. Гел филтрација албумина агрегираног топлотом.....	43
5.1.1.5. AFM анализа величине и структуре нативног албумина и албумина агрегираног топлотом.....	44
5.1.1.6. SEM анализа величине и структуре нативног албумина и албумина агрегираног топлотом.....	44
5.1.2. Анализа величине и структуре нативних и IgG агрегираних топлотом - <i>in vitro</i> аналога имунокомплекса.....	45
5.1.2.1. Изоловање и карактеризација хуманих IgG.....	45
5.1.2.2. Анализа величине нативног IgG и IgG агрегираног топлотом фотон корелационом спектроскопијом.....	48
5.1.2.3. Анализа величине нативног IgG и IgG агрегираног топлотом ултрацентрифугирањем.....	51
5.1.2.4. Гел филтрација IgG агрегираног топлотом.....	52
5.1.2.5. AFM анализа величине и структуре нативног IgG и IgG агрегираног топлотом.....	53
5.1.2.6. SEM анализа величине и структуре нативног IgG и IgG агрегираног топлотом.....	53
5.1.3. Анализа величине и структуре <i>in vitro</i> формираних имунокомплекса фотон корелационом спектроскопијом.....	54
5.2. Анализа величине и структуре СИС здравих особа и особа са РА.....	57
5.2.1. Ниво и садржај имуноглобулина у СИС особа са РА и здравих особа.....	59
5.2.2. Анализа величине колоидних честица СИС здравих особа и особа са РА фотон корелационом спектроскопијом.....	60
5.2.2.1 Анализа величине колоидних честица у збирним узорцима СИС.....	60
5.2.2.2. Анализа величине колоидних честица у појединачним узорцима СИС.....	60

здравих особа и особа са РА.....	64
5.2.2.2.1. Повезаност величине колоидних честица и IgA, IgG и IgM антитела у СИС популацији особа са РА и здравих особа.....	67
5.2.2.3. Ефекат замрзавања и утицај на величину честица имунокомплекса мерених фотон корелационом спектроскопијом.....	71
5.2.3. Поређење резултата анализе величине колоидних СИС честица добијених фотон корелационом спектроскопијом са резултатима добијеним ултрацентрифугирањем на гелу сахарозе, гел филтрацијом и микроскопским методама (SEM и AFM).....	73
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>79</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>81</b>
<b>8. ПРИЛОЗИ.....</b>	<b>92</b>

## 1. УВОД

Предмет истраживања ове дисертације представља испитивање примене фотон корелационе спектроскопије (енглески: *photon correlation spectroscopy, PCS*) у анализи величине колоидних честица које улазе у састав имунокомплекса, при чему су анализирани имунокомплекси периферне крви, тј. циркулишућих имунокомплекси (енглески: *circulating immune complexes, CIC*) здравих особа и особа са реуматоидним артритисом.

Фотон корелациона спектроскопија, такође позната као динамичко расипање светлости (енглески: *dynamic light scattering, DLS*; синоним: *quasi-elastic light scattering*) је техника којом се у колоидним системима одређују величина честица и расподела честица по величини. Широко се примењује у истраживањима у оквиру природних, бимедицинских наука, науке о материјалима, као и индустријским процесима контроле квалитета [1,2]. PCS се примењује као индиректна метода за детекцију и праћење деградације макромолекула, њихове хомо- и хетеро- олигомеризације, полимеризације (укључујући и ензимски катализовану полимеризацију), као и за праћење формирање макромолекулских кластера у реалном времену [1].

Постоји мали број студија чији су резултати потврдили да се применом PCS може детектовати присуство и анализирати величина имунокомплекса, макромолекулских агрегата формираних након везивања антигена и антитела [3-9]. Стварање имунокомплекса је саставни део имунског одговора и неопходно је за уклањање антигена из организма [10]. Биолошка функција имунокомплекса је одређена структуром и количином антитела која их формирају, структуром и количином антигена као и саставом других молекулских конституената који се налазе у саставу имунокомплекса [11]. Поред молекулског састава, биолошка функција имунокомплекса је одређена и њиховом величином. Од величине имунокомплекса зависи и ефикасност њиховог уклањања из циркулације што представља нормалну фазу у имунском одговору којом започиње елиминација антигена из организма. Међутим, од величине имунокомплекса зависи и њихов патогени потенцијал који настаје као резултат неефикасног уклањања имунокомплекса и њиховог таложења у ткивима [12-14]. Уобичајене клиничке манифестације болести посредованих имунокомплексима укључују гломерулонефритис, синовитис и дермални васкулитис. Серумска болест, системски еритематозни лупус и хронични васкулитис повезан са инфекцијом су прототипске болести посредоване имунокомплексима, мада је и низ других болести повезан са неефикасним уклањањем имунокомплекса [15].

Реуматоидни артритис карактерише присуство две врсте аутоантитела за које је показано да формирају имунокомплексе. То су: 1) реуматоидни фактори (енглески: *rheumatoid factor, RF*), аутоантитела која реагују са сопственим IgG антителима, тј. епитопима IgG молекула које се на њима испољавају након везивања са антигеном и 2) аутоантитела против цитрулинираних пептида (енглески: *anti-citrullinated protein antibody, ACPA*) [16,17]. Количина, састав и величина имунокомплекса у циркулацији у реуматоидном артритису одређује, између осталих фактора, тежину клиничке слике [18]. Изучавање величине и структуре имунокомплекса није само од значаја за испитивање патогенезе и дијагностику природно насталих болести посредованих имунокомплексима, већ има велики значај за праћење ефеката (и позитивних и негативних) протеинских биотерапеутика. Наиме, од како је почела интензивнија примена моноклонских антитела као терапеутика, све више се обраћа пажња и на формирање имунокомплекса између терапеутског антитела (који у овом случају представља антиген) и антитела домаћина, јер они утичу и на ефикасност терапије и појаву нежељених инфламаторних реакција, које у многоме зависе и од величине формираних имунокомплекса [19].

Одређивање величине имунокомплекса у системској циркулацији није део рутинске дијагностике болести посредованих имунокомплексима. Методе које се најчешће користе за анализу величине имунокомплекса су ултрацентрифугирање на градијенту сахарозе, гел филтрација, ултрафилтрација, електрофореза и електрофокусирање и микроскопске технике [20-23]. Већина ових метода су релативно компликоване и захтевају више времена за извођење. Због поменутих методолошких ограничења, оне се примењују у основним истраживањима структуре и функције имунокомплекса, али нису нашле своје место у рутинској дијагностици болести које су посредоване имунокомплексима. Резултати малог броја студија су показали да се и фотон корелациона спектроскопија може применити за анализу величине честица које улазе у састав *in vitro* и *in vivo* формираних имунокомплекса. Велика предност фотон корелационе спектроскопије је то што се релативно брзо изводи, не захтева посебну припрему узорка, током анализе узорак се не разблажује и не денатурише и може се користити за даље анализе [2, 24-27].

Циљ истраживања ове дисертације је стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса код људи, за потребе дијагностике болести и стања која су посредована имунокомплексима. На основу дистрибуције величине колоидних честица СИС здравих особа, као референтног система, биће процењена промена величине колоидних честица СИС у болестима посредованим имунокомплексима (на моделу реуматоидног артритиса), чиме ће се потврдити могућност примене ове методе за анализу величине честица у саставу природно формираних имунокомплекса у другим инфективним и аутоимуним болестима, или имунокомплекса формираних као одговор организма на конвенционалне лекове или савремене протеинске биотерапеутике.

## 2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

### 2.1. Имунокомплекси

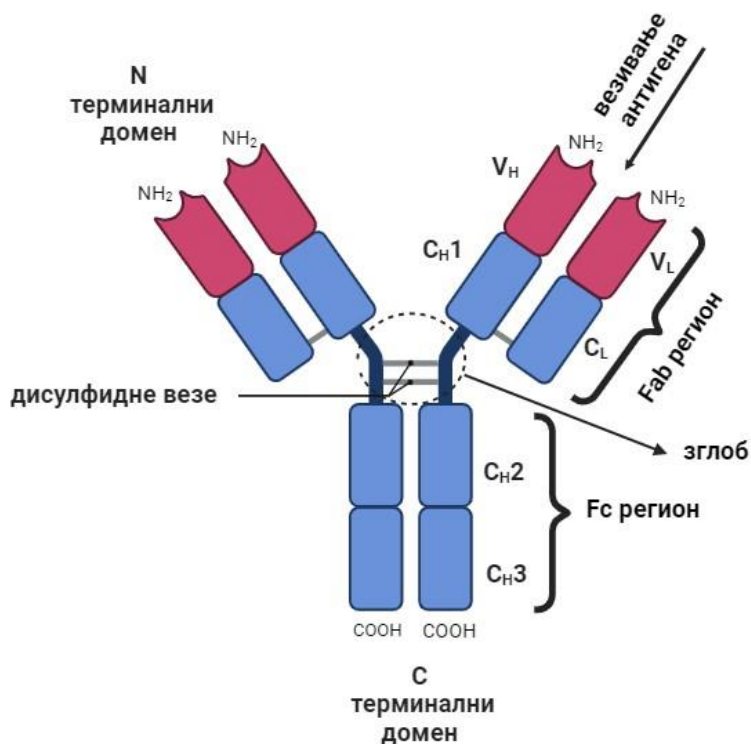
#### 2.1.1. Имуноглобулини

Имуноглобулини су врста протеина који играју кључну улогу у имунском систему човека, јер имају функцију антитела. Налазе се или везани на мембрани Бе лимфоцита где улазе у састав антигенског рецептора ових ћелија, или у крви и у другим телесним течностима где се накупљају као продукт секреције плазма ћелија, терминално диферентованих Бе лимфоцита. Они су главни ефекторски молекули хуморалног имунског одговора, одговарајући на присуство антигена и омогућавајући њихово уклањање из организма. Њихова примарна биолошка функција је препознавање и везивање антигена, након чега се у молекулу имуноглобулина дешавају конформационе промене које омогућавају његове секундарне или ефекторне функције које доводе до неутрализације и елиминације антигена из организма [10].

Основна функционална јединица имуноглобулина је тзв. мономер имуноглобулина, макромолекул који је састављен од два лака (енглески: *light*, *L*) полипептидна ланца сваки са 220 аминокиселина и молекулском масом од 24 kDa, и два тешка (енглески: *heavy*, *H*) полипептидна ланца сваки са 440 аминокиселина и молекулском масом од 55 kDa [10,28]. Лаки и тешки ланци, као и тешки ланци међусобно, повезани су ковалентним дисулфидним (S-S) везама и бројним нековалентним интеракцијама. Тешки ланци се у средишту молекула спајају у тзв. зглобни пептид, који молекулу даје потребну флексибилност (слика 2.1).

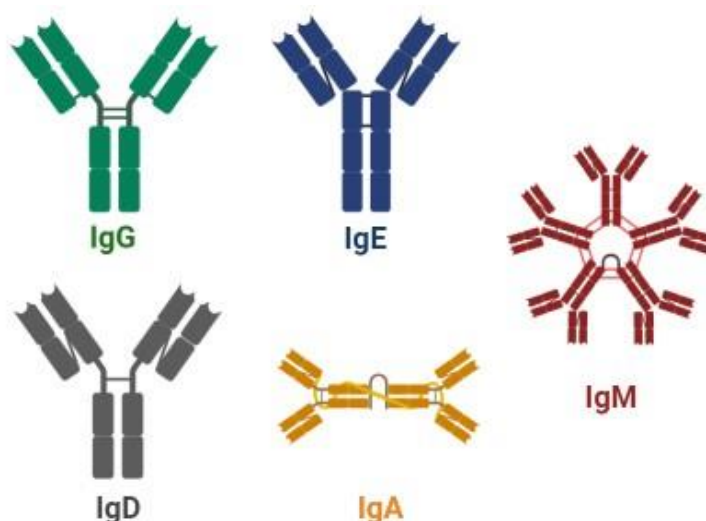
Лаки ланци садрже по два домена, док тешки ланци садрже по четири или пет домена, при чему сваки домен доприноси специфичној биолошкој активности имуноглобулина. С-терминални домен лаког ланца (CL) и три С-домена тешког ланца (CH1, CH2 и CH3) имају непроменљиве низове аминокиселина и називају се константни домени. Преко ових константних домена тешких ланаца имуноглобулини извршавају своје ефекторске функције [29,30].

N-терминални домени тешких и лаких ланаца формирају два антиген-везујућа места (позната као активна места или паратопи) која омогућавају интеракцију са антигенима. Ови домени се називају варијабилним (енглески: *variable*, *V*) због променљивог редоследа аминокиселина. Варијабилни домени лаких ланаца означени су као VL, док су варијабилни домени тешких ланаца означени као VH. Комбинацијом ових домена у парове настају три глобуларне субструктуре у имуноглобулинским молекулима: два идентична Fab региона (састављена од VH/VL и CH1/CL домена) и један Fc регион (са CH2/CH2, CH3/CH3, и CH4/CH4 доменима), који су међусобно повезани зглобним пептидом. Оваква структура зглобног пептида омогућава флексибилност молекула, што му дозвољава да истовремено оствари више различитих интеракција [10,28].



**Слика 2.1.** Структура молекула имуноглобулина (креирано помоћу BioRender.com)

На основу разлика у константним доменима тешких ланаца, имуноглобулини су подељени на класе и подкласе. Ове варијанте се називају изотипске варијанте или изотипови. Код човека постоји пет типова тешких ланаца и, сходно томе, пет класа имуноглобулина: IgM са  $\mu$  тешким ланцима, IgG са  $\gamma$ , IgA са  $\alpha$ , IgE са  $\epsilon$  и IgD са  $\delta$  тешким ланцима [19] (слика 2.2).



**Слика 2.2.** Класе имуноглобулина (креирано помоћу BioRender.com)

У даљем делу текста детаљније су приказане особине три класе имуноглобулина (IgG, IgA и IgM) које су најзаступљеније у периферној крви и чији су нивои, тј. релативне

концентрације и повезаност са појавом честица одређене величине у СИС здравих особа и особа са РА анализирани у овом истраживању.

IgG су најзаступљенија класа имуноглобулина у крви и у екстрацелуларним течностима здравих особа, чинећи око три четвртине свих серумских имуноглобулина. По структури и функцији су најхетерогенија класа имуноглобулина. У крви одраслог, здравог човека налази се од 8 до 17 g/L IgG. На основу разлика у примарној структури тешких ланаца подељени су на четири подкласе (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) [19,28,31,32]. Иако разлике у структури између подкласа чине мање од 5% укупне структуре, оне се значајно одражавају на физичко-хемијске и биолошке карактеристике датих подкласа (табела 2.1).

**Табела 2.1.** Физичко-хемијске и биолошке карактеристике хуманих IgG [19,28,31,32]

Особине	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Тип тешког ланца	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$
Молекулска маса тешког ланца (kDa)	50	50	52-60	50
Тип лаког ланца	$\kappa$ или $\lambda$	$\kappa$ или $\lambda$	$\kappa$ или $\lambda$	$\kappa$ или $\lambda$
Молекулска маса лаког ланца (kDa)	25	25	25	25
Укупна молекулска маса (kDa)	146 000	146 000	170 000	146 000
Аминокиселине у зглобном региону	15	12	62	12
Флексибилност зглобног региона	добра	Ограничена	Изузетна	Ограничена
Интерланчане дисулфидне везе	2	4	11	2
$\kappa/\lambda$ однос	2,4	1,1	1,4	8,0
Изоелектрична тачка (pI)	8,6 $\pm$ 0,4	7,4 $\pm$ 0,6	8,3 $\pm$ 0,7	7,2 $\pm$ 0,8
% од укупних IgG серума	60-72	19-31	6-8	1-4
Просечна концентрација у серуму (g/L)	8	4	0,8	0,4
Опсег концентрација у серуму (g/L)	5-12	2-6	0,5-1	0,2-1
Дистрибуција на површини Бе лимфоцита периферне крви (%)	40	48	8	1
Дистрибуција у плазмочитима костне сржи, тонзила и слезине (%)	64	26	8	1
Брзина катаболизма (дани)	21-23	20-23	7-8	21-23
Пролаз кроз плаценту	+	$\pm$	+	+
Фиксација комплемента класичним путем*	++	+	++	0
Везивање за:				
Fc $\gamma$ I**	+	-	+	+
Fc $\gamma$ II**	+	-	+	-
Fc $\gamma$ III**	+	-	+	-
Реакција са протеином А	+	+	-	+
Функционална валентност***	2	2	2	2
Блокирајућа активност у алергијама	-	-	-	+

\*процес активације система комплемента, тј. система који је део хуморалне гране имунског одговора

\*\*Fc $\gamma$  (Fc-gamma receptor) - протеини који препознају и везују се за Fc фрагмент IgG. Постоје три типа рецептора (Fc $\gamma$ I, Fc $\gamma$ II и Fc $\gamma$ III) који се разликују по структури, афинитету за везивање IgG и типу ћелија на којима се налазе

\*\*\*број антигенских места (епитопа) које једно антитело може истовремено да веже

IgA је најзаступљенија класа имуноглобулина у кожи и слузокожи, и у људском организму се током једног дана синтетише у количини од 60 mg/kg телесне масе, што је количина већа од свих других класа имуноглобулина заједно. Кожа и слузокожа

представљају улазна врата за патогене присутне у спољашњој средини, а IgA у форми тзв. секреторног IgA (sIgA) је саставни део „прве линије одбране“ организма од патогена. У периферној крви налази се у концентрацији од 2 до 3 g/L, по заступљености је друга класа имуноглобулина, одмах после IgG [33,34].

Код људи постоје две подкласе IgA молекула, IgA1 и IgA2 (табела 2.2). Њихови тешки ланци су високо хомологи по својој аминокиселинској секвенци, а највећа разлика између  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  тешких ланаца се налази у региону зглоба, где у  $\alpha 2$  ланцу недостаје низ од 13 аминокиселина што чини овај молекул мање флексибилним, али и мање подложним протеолитичкој деградацији. За разлику од молекула IgG, молекули IgA постоје не само у облику мономера већ и у облику димера. У периферној крви оминира мономерни облик, а дистрибуција подкласа је приближно 90% IgA1 и 10% IgA2. Главна молекулска форма IgA у кожи и слузокожи је sIgA који представља димерну форму. Однос изотипова IgA у слузокожи се разликује од оног у периферној крви и износи приближно 40% IgA1 и 60% IgA2 [29,35].

**Табела 2.2.** Физичко-хемијске и биолошке карактеристике подкласа хуманих IgA [29,33-35]

Особине	IgA1	IgA2
Тип тешког ланца	$\alpha 1$	$\alpha 2$
Молекулска маса тешког ланца (kDa)	50	50
Тип лаког ланца	$\kappa$ или $\lambda$	$\kappa$ или $\lambda$
Молекулска маса лаког ланца (kDa)	25	25
Укупна молекулска маса мономера (kDa)	160	160
Молекулска маса sIgA (kDa)	385	385
Аминокиселине у зглобном региону	22	9
Флексибилност зглобног региона	добра	ограничена
Интерланчане дисулфидне везе	2	1- 2
$\kappa/\lambda$ однос	1,5	1,5
Изоелектрична тачка (pI)	5 $\pm$ 0,3	4,7 $\pm$ 0,3
% од укупних IgA серума	90	10
Просечна концентрација у серуму (g/l)	2,5-3	0,5-1
Опсег концентрација у серуму (g/l)	1-4	0,1-1
Дистрибуција на површини Бе лимфоцита периферне крви (%)	75-80	20-25
Дистрибуција у плазмоцитима костне сржи, тонзила и слезине (%)	80-85	15-20
Брзина катаболизма (дани)	5-6	3-5
Пролаз кроз плаценту	-	-
Фиксација комплемента класичним путем	-	-
Везивање за Fc $\alpha$ RI	+	+
Реакција са протеином А	-	-
Функционална валентност	2/4	2/4
Блокирајућа активност у алергијама	+	+

IgM је прва класа имуноглобулина која се секретује након првог сусрета организма са антигеном у тзв. примарном имунском одговору. Код људи, налази се у форми пентамера или ређе хексамера. Неке од основних физичко-хемијских и биолошких карактеристика IgM су приказане у табели 2.3 [36].



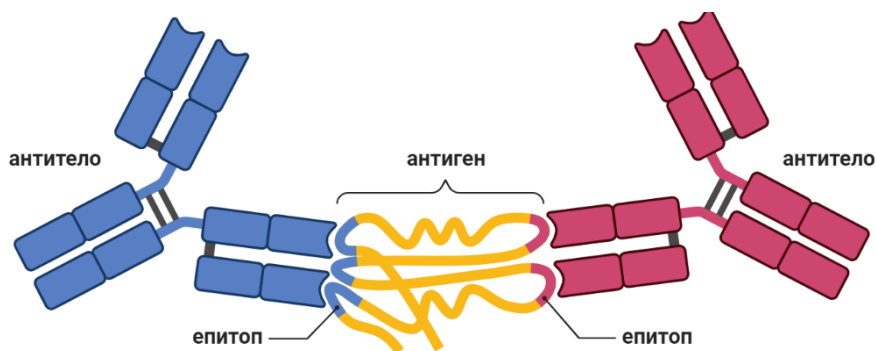
Табела 2.3. Физичко-хемијске и биолошке карактеристике хуманих IgM [36]

Особине	Пентамер IgM
Тип тешког ланца	μ
Молекулска маса тешког ланца (kDa)	65-70
Тип лаког ланца	κ или λ
Молекулска маса лаког ланца (kDa)	25
Укупна молекулска маса	900 000
Интерланчане дисулфидне везе	10 – 20
κ/λ однос	1,5
Изоелектрична тачка (pI)	6,5 ± 0,9
Просечна концентрација у серуму (g/l)	1,0 - 1,5
Распон концентрација у серуму (g/l)	0,4 - 2,3
Дистрибуција на површини Бе лимфоцита периферне крви (%)	50 – 60
Брзина катаболизма (дани)	5
Пролаз кроз плаценту	-
Фиксација комплемента класичним путем	+
Везивање за:	
FcRα/μ	+
pIgR	+
FcRμ	+
Реакција са протеином А	-
Функционална валентност	10
Блокирајућа активност у алергијама	-

### 2.1.2. Структура и функција имунокомплекса

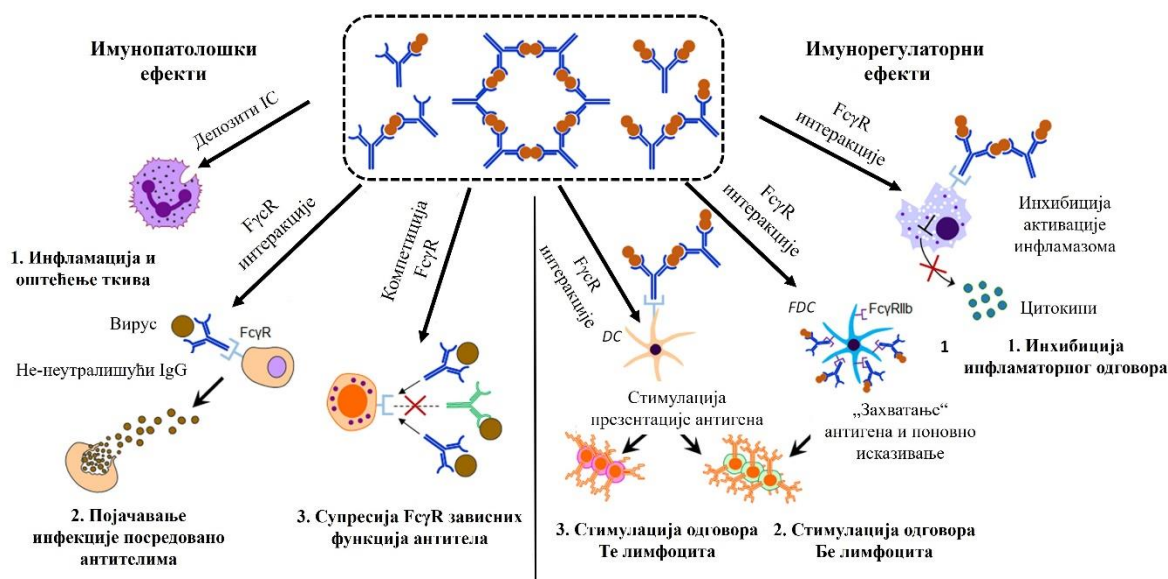
Имунокомплекси се формирају након препознавања и везивања антитела за специфичан антиген. Антигеност великих молекула зависи од распореда структурних група званих епитопи или антигене детерминанте на њиховој површини, јер они представљају делове молекула директно укључене у везивање са молекулима антитела и одражавају специфичност реакције антиген-антитело.

Комплекси антигена и антитела формирају тродимензионалну структуру која има облик решетке (енглески: *lattice-type*), чија величина зависи пре свега од односа антитела и антигена, али и од величине антигена, густине епитопа, класе и подкласе антитела, афинитета и поликлоналности/моноклоналности антитела. Између антигена и антитела формирају се различите нековалентне интеракције (водоничне, јонске, Ван дер Валсове, итд.), а физичко-хемијске карактеристике имунокомплекса су заправо резултат динамичког процеса формирања и разградње ових веза у непосредним условима јонске јачине и рН, што има за последицу непрекидну промену својства имунокомплекса *in vivo*. Након везивања антигена, структура молекула IgG се мења, а њихова конфигурација (облик латиничног слова Y) са бројним „отвореним“ неполарним групама, које истискују воду, фаворизује аутоагрегацију молекула имуноглобулина у раствору (слика 2.3) [37].



Слика 2.3. Структура имунокомплекса (креирано помоћу BioRender.com)

Стварање имунокомплекса је саставни део нормалног имунског одговора и неопходно је за успешну елиминацију антигена из организма [10]. У улози имуномодулатора, имунокомплекси могу иницирати проинфламаторне или антиинфламаторне реакције. Тип реакције која ће бити покренута зависи од њихове величине, састава и структурних карактеристика молекула који чине имунокомплексе, укључујући протеине, нуклеинске киселине, моносахариде и липиде (слика 2.4) [10,11,38,39]. Такође, резултати бројних лабораторијских и клиничких студија су показали да би се имунокомплекси могли користити у терапији инфективних болести [40].



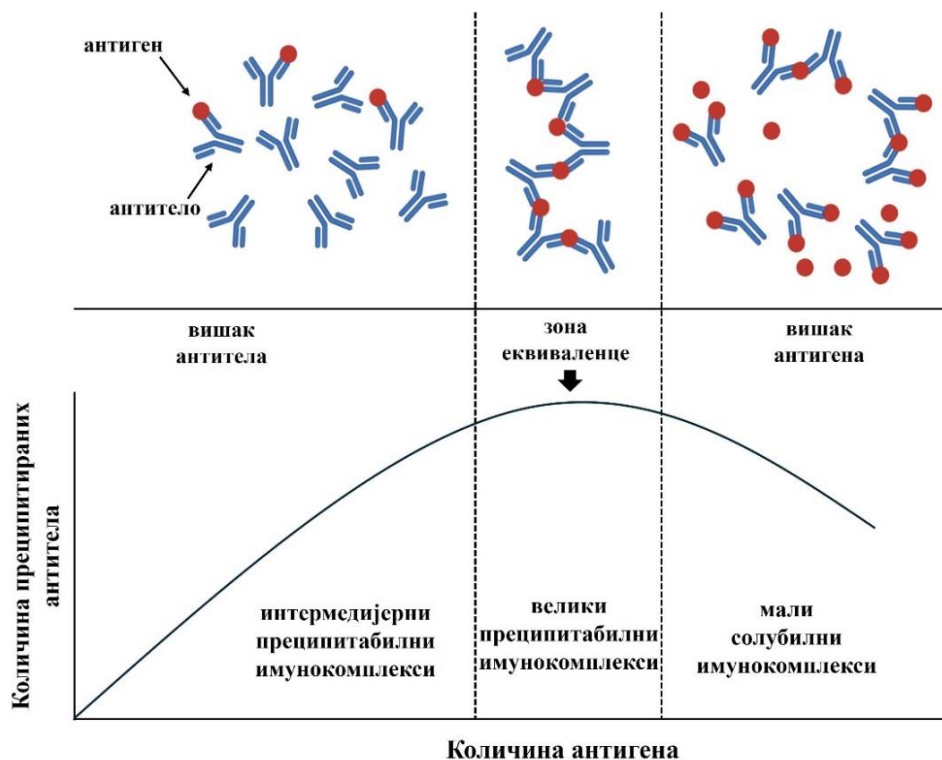
Слика 2.4. Имунорегулаторни и имунопатогени ефекти имунокомплекса.

IC: имунокомплекси; DC: дендритске ћелије; FCD: фоликулодендритске ћелије; FcγR: рецептори за Fc фрагмент IgG (модификовано из [39])

Биолошка функција имунокомплекса је одређена изотипом антитела која их формирају и хемијском структуром антигена и конституената који у ове комплексе улазе, као и макромолекулским везама које се формирају независно од веза формираних између антигена и антитела [11]. Поред хемијске структуре антигена и других конституената (протеини, липиди, нуклеинске киселине, шећери) биолошка функција антитела је одређена и њиховом величином. Од величине имунокомплекса зависе и ефикасност

њиховог уклањања из циркулације (нормална фаза у имунском одговору која започиње након елиминације антигена из организма) и патогени потенцијал (настаје као резултат неефикасног уклањања имунокомплекса и њиховог таложења у ткивима што је основ за започињање нежељеног инфламаторног процеса).

Ефикасност уклањање имунокомплекса је одређена квантитативним односом антигена и антитела. Као што је на слици 2.5 приказано, величина и солубилност/преципитабилност имунокомплекса зависе од односа антигена и специфичног антитела. Са порастом концентрације антигена количина антитела која са датим антигеном формирају имунокомплексе, и величина формираних имунокомплекса постепено расте (зона вишка антитела), након тога достижу плато (зона еквиваленце, тј. тачка максималне преципитације), а потом опада (зона вишка антигена). Када су антитело и антиген у односу моларне еквиваленце, формирају се велики, нерастворни, тј. преципитабилни имунокомплекси. Имунокомплекси које се формирају у вишку антитела су такође велики, али нису патогени јер се лако уклањају из организма. Имунокомплекси формиран у великом вишку антигена су мали, по правилу остају у циркулацији или се брзо уклањају, и представљају мали ризик за покретање инфламаторне реакције која би довела до оштећења ткива. Међутим, имунокомплекси формиран у благом вишку антигена, тј. имунокомплекси средње величине имају велики патогени потенцијал. Ови имунокомплекси су солубилни, циркулацијом се разносе по организму, таложе се у ткивима (нпр. на синовијалним мембранама зглобова) и активирају систем комплемента (групу протеина плазме) чиме се започињу инфламаторни процеси који доводе до оштећења ткива. Због своје величине ови имунокомплекси се не могу ефикасно уклонити из организма (процесима имуноадхеренце и фагоцитозе) тако да ни започета инфламаторна реакција не може бити „угашена“ [12-14].



Слика 2.5. Величина и преципитабилност имунокомплекса одређени односом антигена и антитела (модификовано из [12,13])

Садржај имунокомплекса се повећава у крвном серуму и у другим телесним течностима током различитих системских болести. Ниво СИС се мења током патогенезе,

као и њихова структура. Физичко-хемијска својства (најпре величина) и биолошка активност имунокомплекса зависе од карактеристика антигена и функционалних карактеристика антитела (изотипа, гликозилације и способности везивања комплемента). Из наведених разлога, анализа величина СИС може послужити као основа за дијагностику многих патологија повезаних са функционисањем имунског система и може да има прогностичку вредност, или да се употреби као параметар за мониторинг ефикасности примењене терапије. Уз то, детекција имунокомплекса у биолошким узорцима, процена њихове димензионалности и одређивање изотипског састава имуноглобулинских компонента у СИС може допринети бољем разумевању одређених метаболичких процеса код људи и животиња [9].

### 2.1.3. Болести посредоване имунокомплексима – доказивање, квантификација и изоловање имунокомплекса

Болести посредоване имунокомплексима настају услед депозиције имунских комплекса у различитим ткивима чиме започињу неконтролисане инфламаторне реакције. Болести које се често јављају као последица овакве неконтролисане имунске реакције су системски еритематозни лупус, гломерулонефритис, реуматоидни артритис, серумска болест, васкулитис. Болести посредоване имунокомплексима представљају хетерогену групу стања која захтевају комплексну дијагностику и мултидисциплинарни приступ у лечењу [15]. Разумевање механизма формирања и депозиције имунокомплекса, као и примена савремених дијагностичких техника, од кључног су значаја за ефикасно праћење тока развоја и лечења ових болести, јер рана дијагноза и адекватно лечење могу значајно побољшати прогнозу и квалитет живота пацијената.

Присуство имунокомплекса се може доказати анализом ткива или анализом телесних течности. Иако имунохистохемијске методе за сада једине омогућавају директну анализу имунокомплекса депонованих у ткивима, главни недостатак ових метода лежи у компликованом поступку добијања ткивних узорака (узорковање ткива није рутински поступак), па је анализа телесних течности (серум и плазма периферне крви, цереброспинална течност, салива) метода избора у изучавању патогенезе болести посредованих имунокомплексима [41,42].

За потребе анализе имунокомплекса у биолошким течностима, развијене су методе засноване на њиховим физичко-хемијским својствима (молекулска маса и преципитабилност) или интеракције са другим биолошким молекулима. Највише примењиване методе за изоловање имунокомплекса из биолошких течности, а које су засноване на њиховим физичко-хемијским карактеристикама су ултрацентрифугирање и преципитација полиетилен гликолом (енглески: *polyethylene glycol*, PEG). PEG се веома често користи за издвајање имунокомплекса из биолошких течности, јер ефикасно таложи имунокомплексе, тј. агрегиране имуноглобулине и молекуле који улазе у састав ових агрегата, док је ефикасност таложења нативних имуноглобулина и других биомакромолекула ниска. Ефикасност и селективност таложења имунокомплекса зависи од концентрације PEG. Високе концентрације PEG преципитирају мономерне IgG, док концентрације од 2% до 5% преципитују агрегиране IgG [43]. Преципитација имунокомплекса раствором PEG је лака за извођење и не доводи до денатурације макромолекула, што омогућава њихову даљу анализу или пречишћавање. Међутим, иако се користи и за квантификацију имунокомплекса, ова метода се не сматра ни специфичном ни осетљивом [44].

Друга велика група метода која се користи за квантификовање и изоловање имунокомплекса је заснована на њиховој интеракцији са већим бројем биолошких молекула (C1q, конглутинин, Fc рецептор, RF, стафилококни протеин А, стрептококни протеин Ге и други). У највећем броју тестова ови протеини се примењују изоловани и

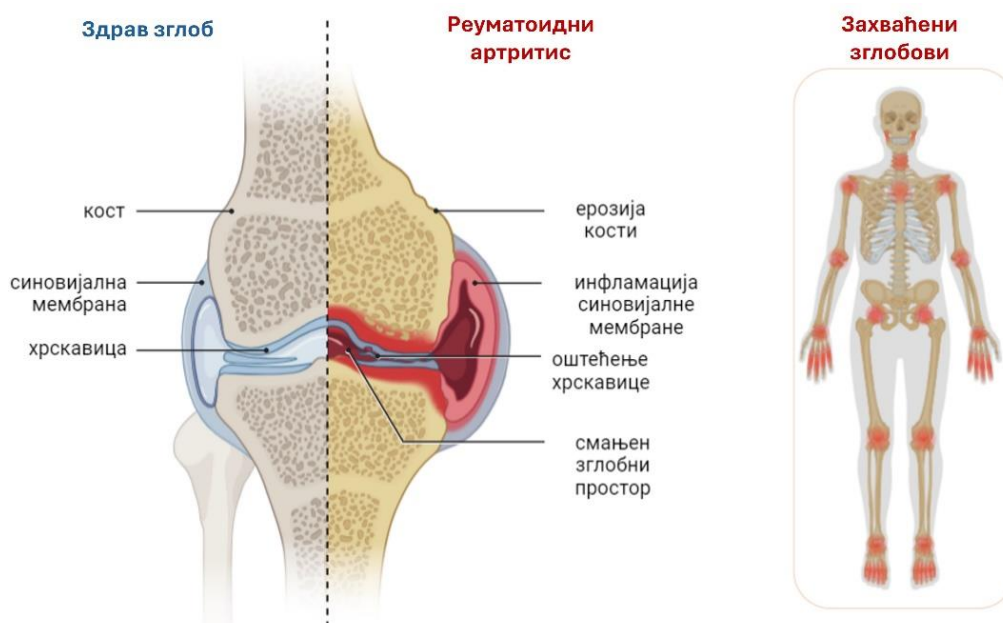
„понуђени“ имунокомплексима у саставу течне или чврсте фазе одређеног теста. Међутим, квантификовање имунокомплекса може да се ради и ћелијским тестовима, где се њихов ниво мери на основу интеракција са ћелијама које експримирају неки од наведених молекула. Најчешће се за ове сврхе користе тестови засновани на интеракцији имунокомплекса са Raji ћелијама (лимфобластоидна ћелијска линија) или тромбоцитима [45].

Иако постоји релативно велики број метода за изоловање и детекцију имунокомплекса, применом једне методе није могуће изоловати ни квантификовати све имунокомплексе присутне у једном узорку због њихове велике хетерогености – и у молекулском саставу и у величини.

### 2.1.3.1. Аутоантитела и имунокомплекси у реуматоидном артритису

У овом истраживању анализирани су величине колоидних честица које улазе у састав СИС у крви пацијената оболелих од реуматоидног артритиса, као модела болести у чију патогенезу су укључени имунокомплекси.

РА је хронична упала зглобова која погађа 0,5-1% светске популације, при чему је учесталији код жена него код мушкараца у односу 3:1. Први симптоми се обично јављају између 35. и 65. године, а болест се манифестује болом, отицањем, укоченошћу и постепеним губитком функције зглобова [46], као што је приказано на слици 2.6. Код већине оболелих, РА је тешка болест која доводи до прогресивног оштећења зглобова, слабљења или губитка радне способности и самосталности, што на крају може довести до инвалидитета. Животи век оболелих од РА може да буде и до 15 година краћи од очекиваног [46,47].



Слика 2.6. Клиничке манифестације реуматоидног артритиса (креирано помоћу BioRender.com)

Реуматоидни артритис карактерише присуство две врсте аутоантитела за које је показано да формирају имунокомплексе, RF и АСРА [16,17]. На основу националног водича добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење реуматоидног артритиса из 2013. године, присуство RF и АСРА у крви и налаз ерозије ткива потврђују дијагнозу, а њихово одсуство не искључује постојање болести. Ерозије се код 50% пацијената могу

открити већ у прва четири месеца од почетка болести, што указује на значајно оштећење зглобова [46]. Верује се да су ова аутоантитела значајни биомаркери у предвиђању клиничког тока болести, али упркос обимним истраживања, добијени резултати су и даље контрадикторни [48-54].

Иако је деценијама познато присуство имунокомплекса који садрже RF [55] и АСРА [56] у периферној крви и инфламаторним зглобовима пацијената са РА, због методолошких ограничења проучавање нивоа и састава имунокомплекса у реуматоидном артритису се користи пре свега у истраживачке сврхе. Раније студије су показале да синовијална течност садржи већи ниво имунокомплекса од серума истих особа, и да ниво имунокомплекса у периферној крви није нужно повећан, посебно у раним фазама РА [57-60]. Међутим, имуномодулаторне функције имунокомплекса не зависе само од њихове концентрације, већ и од њихове величине и молекуларног састава. Показано је да и мале промене у структури имунокомплекса значајно утичу на њихов функционални капацитет [61], што указује на неопходност проучавања структуре имунокомплекса, чак и ако њихова концентрација није значајно повећана.

Имунокомплекси доводе до локалне и системске инфлације у РА, али њихова прецизна улога у патогенези РА још увек није детаљно разјашњена. Претпоставља се да имунокомплекси у синовијалној течности доприносе патогенези РА кроз активацију каскаде комплемента, активацију имунских ћелија преко Fc рецептора, директним уништавањем хрскавице и производње фактора некрозе тумора и других проинфламаторних медијатора у синовијалним ткивима [62]. Иако су имунокомплекси који се стварају у синовијалној течности одговорни за појаву клиничких манифестација карактеристичних за РА, сакупљање узорка синовијалне течности је инвазивно, и не ради се рутински, већ у специјализованим клиникама. Из тих разлога, у доста научних студија анализа имунокомплекса у РА је урађена „посредно“ анализом СИС који у себи садрже имунокомплексе који су из синовијалне течности доспели у системску циркулацију [55,63-66].

Значај изотипова имуноглобулина као структурних елемената СИС у РА потврђено је студијама које показују да имунокомплекси који садрже IgG регулишу хомеостазу костију [67], док имунокомплекси који садрже IgA индукују ресорпцију костију посредовану остеокластима кроз интеракцију IgA-Fc $\alpha$ RI [68]. Имунокомплекси који садрже IgA су такође моћни активатори неутрофила и индуктори формирања неутрофилних екстрацелуларних мрежа (енглески: *neutrophil extracellular traps, NET*) [69] и локалне инфламације у РА.

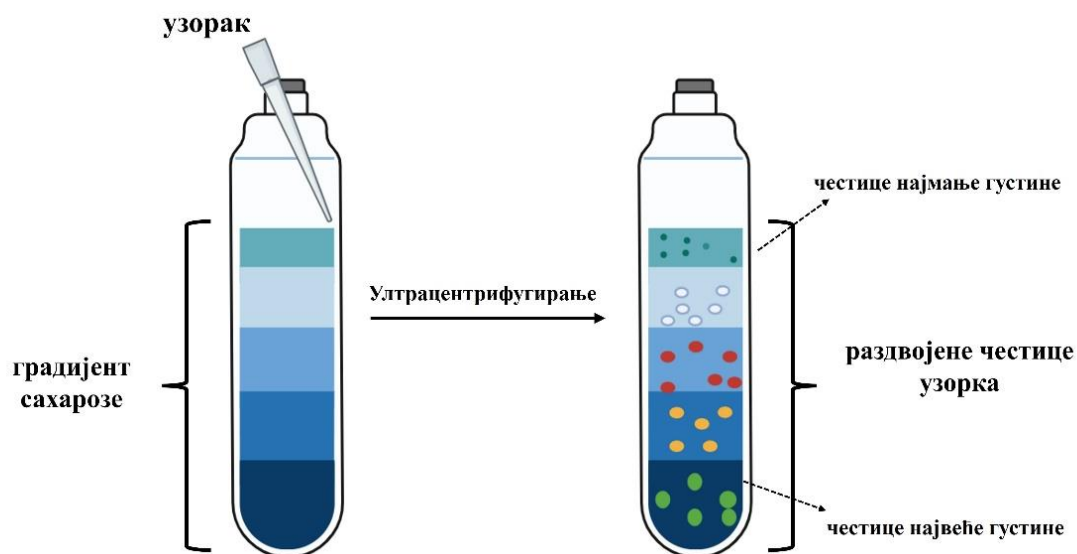
Количина, састав и величина СИС у реуматоидном артритису одређује, између осталих фактора, тежину клиничке слике [18]. Величина СИС у РА до сада није интензивно изучавана и не постоји рутински дијагностички метод за одређивање величине имунокомплекса у овој или у другим болестима које су посредоване имунокомплексима.



#### 2.1.4. Методе које се у научним истраживањима примењују за анализу величине имунокомплекса

Методе које се најчешће примењују за анализу величине имунокомплекса су ултрацентрифугирање на градијенту сахарозе, гел филтрација, микроскопске методе, као и методе базиране на дифракцији (расипању) светлости [20-23]. Већина ових метода захтевају комплексну припрему узорака, као и више времена за извођење, па се одређивање величине имунокомплекса у системској циркулацији врши само за потребе научних истраживања, али не и у рутинској дијагностици [70,71].

Ултрацентрифугирање на градијенту сахарозе је метода која се заснива на седиментацији (таложењу) честица у дисперзним системима (као што су колоидни системи макромолекула). Заснива се на центрифугалној сепарацији честица у градијенту густине који се формира од различитих концентрација сахарозе. Користе се раствори сахарозе јер они формирају стабилан градијент густине при центрифугирању, што омогућава прецизно раздвајање честица на основу њихових физичких својстава. Ултрацентрифугирањем се развијају веома високе брзине ротације како би се генерисала снажна центрифугална сила. Током ултрацентрифугирања честице мигрирају кроз градијент до оне густине раствора сахарозе која одговара њиховој густини. Веће и теже честице ће седиментирати брже и наћи ће се на већој дубини градијента сахарозе након центрифугирања [72], као што је приказано на слици 2.7. На тај начин се честице раздвајају према својој величини и густини. Ултрацентрифугирање се користи за детекцију имунокомплекса, јер се имунокомплекси у различитим биолошким течностима таложу због велике брзине седиментације. Међутим, ова метода за раздвајање честица није селективна, јер и други велики биомолекули присутни у течности такође могу да преципитирају [45]. Овом методом су Magdeed и сар. (1991) одредили величину имунокомплекса присутних у циркулацији пацијената са РА при чему је показано је да је присуство већих имунокомплекса повезано са озбиљнијим компликација болести (тзв. екстраартикуларним манифестацијама)[55].

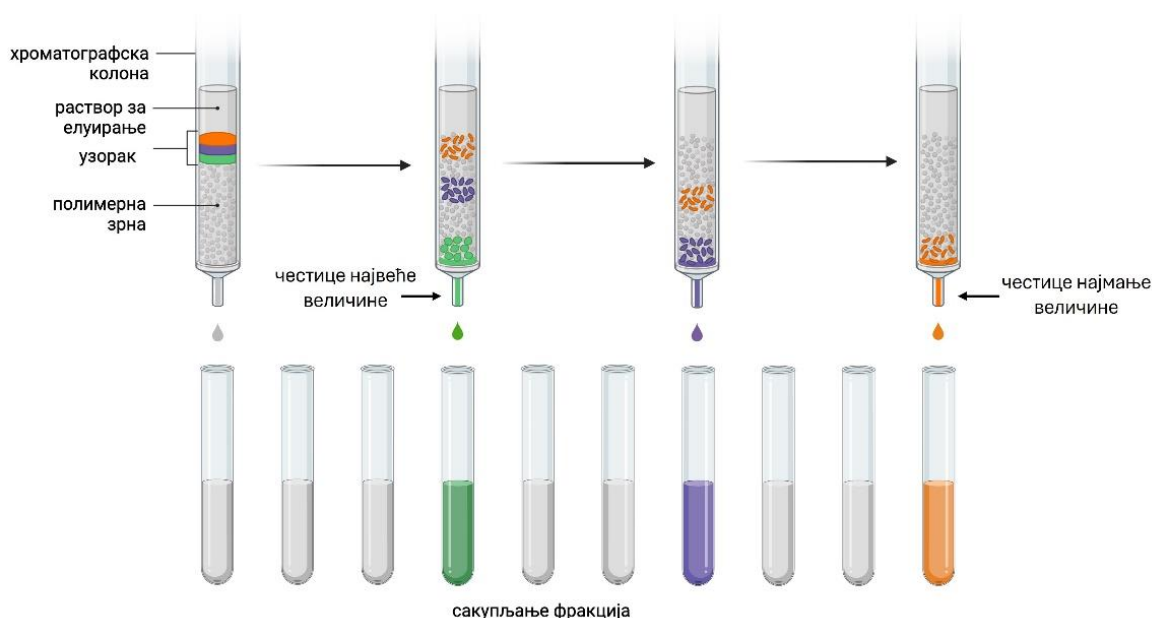


Слика 2.7. Раздвајање честица комплексне смеше ултрацентрифугирање на градијенту сахарозе (креирано помоћу BioRender.com)

Гел филтрација, позната и као молекулско сејање, ексклузивна хроматографија или гел хроматографија, је метода која се користи за раздвајање молекула на основу молекулске масе. Колона за гел филтрацију је напуњена полимерним зрнима са контролисаним величинама пора. Молекули већи од величине пора пролазе кроз гел без

задржавања и бивају елуирани (испрани) у првом хроматографском пику. Молекули који су знатно мањи од величине пора лако улазе у поре гела, задржавају се у њему па дуже путују кроз гел и елуирају се у наредним хроматографским врховима тј. што је молекул мањи, дуже му треба да прође кроз колону [73] (слика 2.8). Овом методом се могу раздвојити прави од колоидних раствора, могу се уклонити соли или изменити пуферски системи у протеинским растворима, или раздвојити на основу њихове величине макромолекулски конституенти у саставу комплексне смеше, какву представљају и имунокомплекси [74]. Међутим, сама припрема експеримента је захтевна, јер захтева пажљиву оптимизацију параметара као што су избор матрикса, пуфера за елуирање и брзине протока. Такође, имунокомплекси могу бити склони агрегацији током процеса гел филтрације и могу интераговати са матриксом, што за последицу може да има нетачну процену величине честица или губитак узорка. Гел филтрација може бити осетљива на промене рН, јонске јачине и температуре, што такође може утицати на добијене резултате [75].

Иако је гел филтрација веома корисна метода за фракционисање макромолекула, због наведених недостатака и времена потребног за њено извођење, одређивање величине имунокомплекса овом методом се примењује само за потребе истраживања и на малом броју узорака.

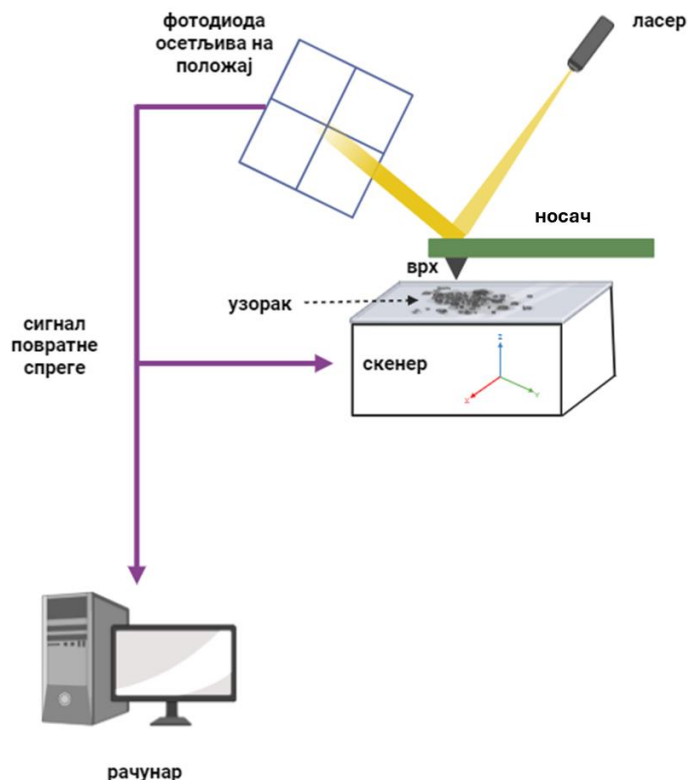


**Слика 2.8.** Гел филтрација  
(креирано помоћу BioRender.com)

Микроскопија атомских сила (енглески: *Atomic Force Microscopy, AFM*) је техника микроскопије која омогућава визуализацију површине узорка на атомском нивоу. Користи се за детаљну анализу топографије, морфологије и механичких својстава раличитих материјала, укључујући и биолошке узорке. Заснива се на мерењу међумолекулских сила које делују између атома испитиваног узорка и атома на врху мерне сонде. Интензитет (неполарних) међумолекулских сила зависи од растојања између честица у интеракцији, што омогућава да се мерењем интензитета силе прецизно одреди растојање од атома узорка. На основу тако одређених вредности формира се слика [76]. Када се интензитет међумолекулских сила измери на више тачака на површини неког узорка и након њиховог спајања, добија се информација о морфологији узорка. Мерења се изводе помоћу сонде направљене од силицијума или силицијум-нитрида која на свом крају има веома оштар врх и налази се на носачу. Када се врх приближи



површини узорка, атомске силе између врха и узорка изазивају помак носача. Овај помак се детектује преко ласерског зрака који се одбија од горње површине носача и пада на фотодетектор (слика 2.9). Промене у положају ласерског зрака на фотодетектору омогућавају мерење помака носача и тако добијени сигнал се коригује помоћу негативне повратне спреге. Током снимања, сонда врши интеракцију са површином узорка који се налази на пиезоелектричном скенеру и даје информацију о димензијама узорка [76,77].



Слика 2.9. Шематски приказ AFM система (модификовано из [78])

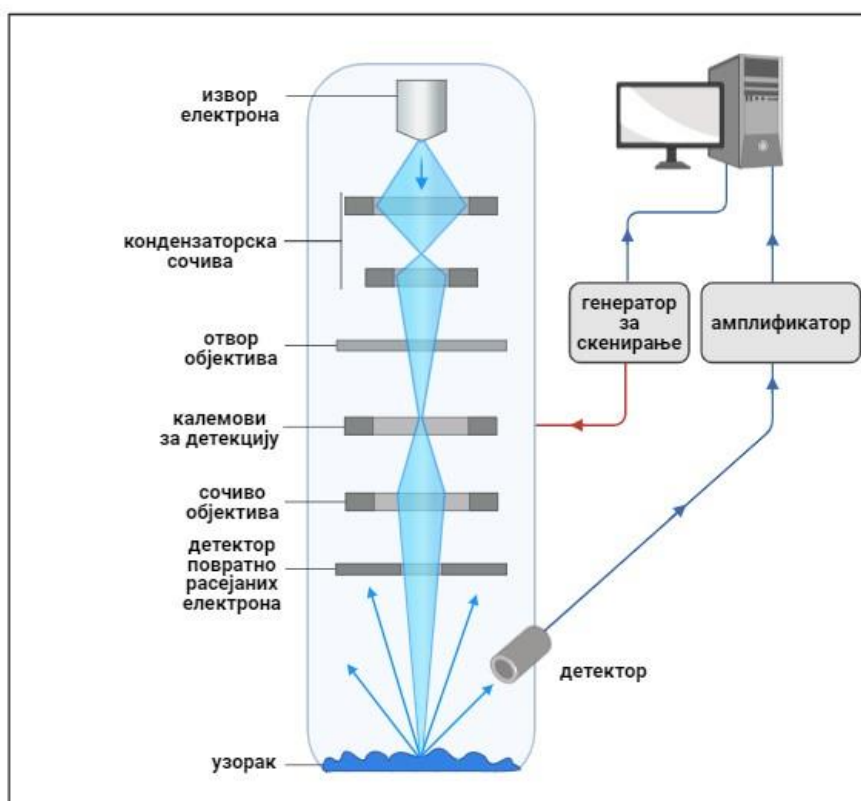
AFM се може користити за истраживање величине, структуре и дистрибуције агрегата и коришћена је, на пример, за проучавање инсулинских фибрила и коњугованих IgG агрегата [24]. Када се користе технике снимања за визуелизацију агрегације протеина, припрема узорка је најбитнији корак, јер она најчешће доводи до промена, како величине тако и структуре молекула, и на тај начин се могу добити резултати који не одговарају физиолошким односно реалним вредностима. Такође, приликом анализе слика потребно је пажљиво размотрити изабрану област слике како би се осигурала истинита репрезентација целог узорка који се анализира [24]. У већини студија које су се бавиле карактеризацијом имунокомплекса AFM методом, праћени су начини везивања антитела за специфични антиген [79-82].

Применом AFM методе је тешко разликовати агрегиране од неагрегираних структура и веома је захтевно избројати довољно велики број честица да би се добила репрезентативна расподела величина [83]. Из наведених разлога је неопходна и примена других метода (као што је PCS) за прецизније одређивање расподеле величина честица испитиваног узорка [84].

Скенирајућа електронска микроскопија (енглески: *scanning electron microscopy*, SEM) пружа високу просторну резолуцију и омогућава детаљну визуелизацију честица унутар имунокомплекса. Електронски снопови омогућају јасно разликовање величине честица унутар имунокомплекса, пружајући детаљне информације о њиховој величини, облику и расподели.

Принцип рада SEM-а заснива се на интеракцији површине материјала са примарним електронским снопом, што омогућава формирање слике структуре површине. При интеракцији снопа са атомима површине материјала, генеришу се различити типови сигнала, укључујући повратно расејане електроне, секундарне електроне и карактеристичне X-зраке (слика 2.10). Повратно расејани електрони настају када примарни електрони одбијају назад са површине материјала, док секундарни електрони настају избацавањем електрона из атомских орбитала материјала. Карактеристични X-зраци настају када избачени електрони остављају празнине у атомским љускама које се попуњавају електронима из виших енергетских нивоа, што доводи до емисије фотона са специфичном енергијом за сваки елемент. Детектори за повратно расејане и секундарне електроне омогућавају креирање слика површинске морфологије високе резолуције и топографије материјала, док детектори за карактеристичне X-зраке омогућавају анализу елементног састава површине [85].

Као и AFM, и SEM се деценијама користи, како за морфолошку анализу имунокомплекса [86] тако и за одређивање њихове величине [3].



Слика 2.10. Шематски приказ SEM система  
(креирано помоћу BioRender.com)

Постоји мали број студија које су показале да се и PCS може применити за анализу величине честица које улазе у састав *in vitro* и *in vivo* формираних имунокомплекса [3-9].

Како имунокомплекси представљају *in vivo* формиране агрегате антитела и антигена, овом методом је могуће пратити кинетику формирања комплекса антигена и антитела [87], детектовати имунокомплексе у серуму и синовијалној течности особа са реуматоидним артритисом [4], детектовати присуство LDL-IgG имунокомплекса код особа са атеросклерозом [7] анализирати природу имунокомплекса код особа са саркодиозом и плућном туберкулозом [8] и пратити појаву и уклањање имунокомплекса у крви након оброка, код људи и експерименталних животиња [9]. Такође, показано је да се овом методом може анализирати величина нативних говеђих IgG и IgG агрегираних

топлотом (*in vitro* модел имунокомплекса) као и величина колоидних честица у саставу СИС здраве телади и телади оболеле од бронхопнеумоније [88].

György и сар. (2011) су показали могућност примене PCS за мерење величине имунокомплекса у синовијалној течности код пацијената са РА [4], али су Williams и Maskman (2011) указали да је за адекватну биофизичку карактеризацију имунокомплекса код РА потребно коришћење више метода, као и стандардизација преаналитичких и аналитичких корака [89].

## 2.2. Фотон корелациона спектроскопија

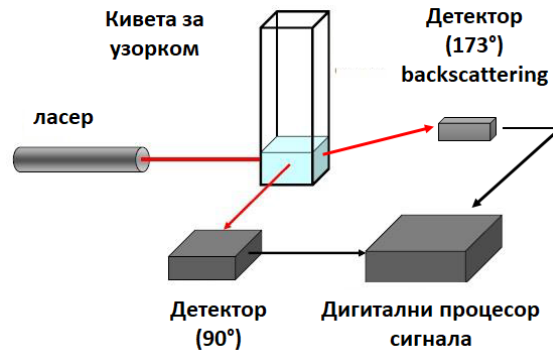
### 2.2.1. Историјат развоја

Прва истраживања методе расипања светлости датирају из XIX века, када су научници почели да проучавају интеракцију светлости са материјалом. Ране студије укључују рад Џона Тиндала (John Tyndall) са колоидним суспензијама честица већих од таласне дужине упадне светлости (Тиндалов ефекат) и рад Лорда Рејлија (Lord Rayleigh) са колоидним суспензијама које садрже честице мање од таласне дужине светлости (Рејлијево расејање). Почетком XX века Алберт Ајнштајн (Albert Einstein) је развио теоријски оквир за Брауново кретање, које описује случајно кретање честица у течности. Ово истраживање је било кључно за каснији развој метода расипања светлости, јер је омогућило боље разумевање динамике честица у раствору. Густав Миј (Gustav Mie) је 1908. године развио теорију (Мијева теорија) која проширује Рејлијев модел на веће честице у поређењу са таласном дужином светлости, узимајући у обзир облик честице и разлике у индексу преламања између честица и средине у којој су честице присутне. У истом периоду, Ајнштајн и Смолучовски (Smoluchowski) су развили флукуациону теорију расејања светлости, према којој се течност треба посматрати као континуални медијум где топлотне флукуације стварају нехомогености, које резултирају флукуацијама густине и концентрације. Пар година касније Петер Деби (Peter Debye) је дао теорију да се расипање може проучавати независно од претпоставки о маси, величини или облику. Кабанез (Cabannes) и Рокард (Rocard) (1929), као и Ганс (Gans) (1921;1923) су се бавили теоријом оптички анизотропног расејања као и његовим утицајем на поларизацију расејане светлости. Средином XX века Цим (Zimm) је модификовао Rayleigh–Gans–Debye теорију, која је дала темељ модерног приступа расипања светлости који се користе за одређивање величине, облика и молекулске масе макромолекула у раствору. Шездесетих година XX века појава ласера омогућила је изузетно кохерентан и интензиван извор светлости, што је довело до развоја нових метода расејања светлости за проучавање молекула у течностима, а развијени су и први дигитални аутокорелатори. Многи истраживачи су затим током година развили различите приступе за одређивање коефицијента дифузије молекула у раствору и својим истраживањима довели до развоја савремених инструмената за динамичко расипање светлости који данас играју кључну улогу у интеракцији протеина са малим молекулима, другим протеинима, и нуклеинским киселинама, али и за испитивање осталих типова макромолекулских интеракција као и анализу наноматеријала [2,90].

## 2.2.2. Принципи фотон корелационе спектроскопије

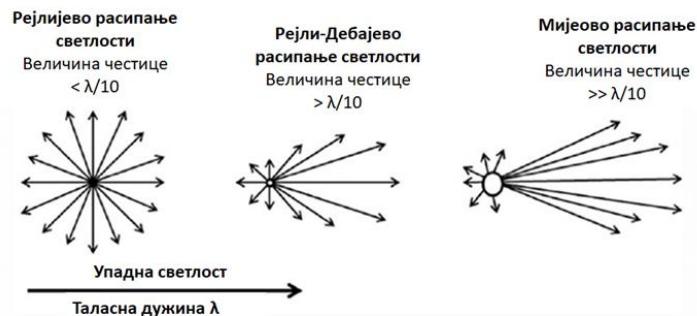
Фотон корелациона спектроскопија је техника којом се у колоидним системима одређује величина честица и расподела честица по величини. Одређивање величине честица овом техником изводи се мерењем интензитета расуте светлости под углом од  $90^\circ$  и  $173^\circ$  у зависности од типа уређаја који се користи. Стандардне компоненте уређаја за динамичко расипање светлости су:

- Извор светлости, најчешће ласер (HeNe)
- Телија за узорак, најчешће цилиндрична кивета са пречником између 10-30 mm
- Детектор, фотомултипликаторска цев или врло осетљива напредна фотодиода, за који је повезана оптика
- Хардвер компоненте повезане на детектор које се користе за обраду сигнала (слика 2.11).



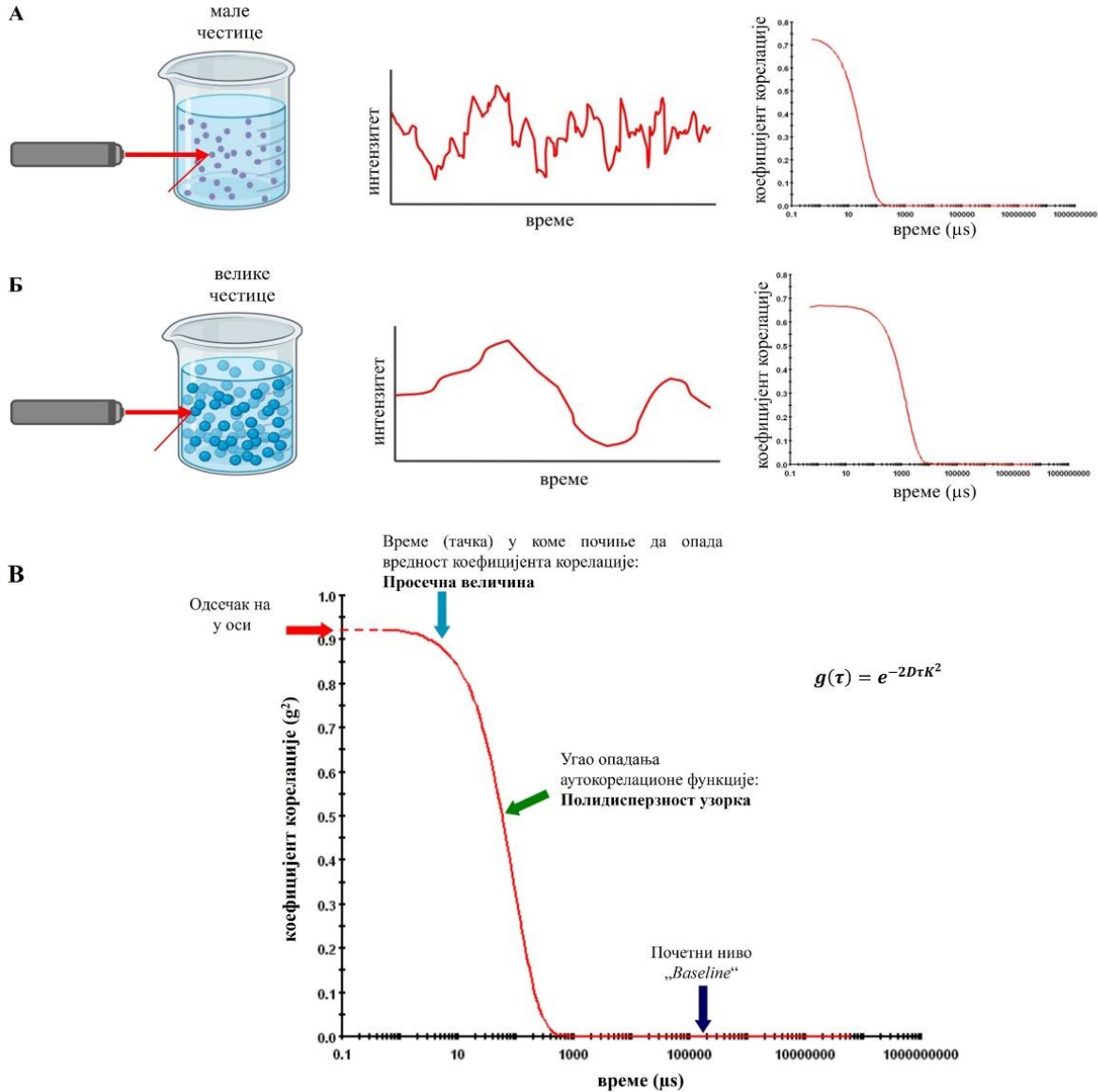
Слика 2.11. Шематски приказ грађе уређаја за фотон корелациону спектроскопију

Расипање светлости је резултат интеракције светлости са електричним пољем честица или молекула. Упадни зрак фотона индукује осцилацију дипола у електронском облаку, а због промене дипола, енергија се ослобађа у свим правцима и та енергија се зове расута светлост. Интензитет расуте светлости пропорционалан је шестом степену полупречника честице [91]. За мале честице, чији је пречник мањи од десетине таласне дужине упадне светлости, примењује се Рејлијева теорија расипања светлости. Рејлијево расипање је изотропно, тј. подједнако у свим правцима, носи исту енергију као упадна светлост (еластично расипање) и не зависи од угла [84]. Међутим, када величина честица прелази овај праг од  $\lambda/10$  онда је Рејлијево расипање замењено анизотропним, Мијеовим расипањем, где је расута светлост неједнака у енергији (нееластично расипање) у односу на упадни зрак и зависи од упадног угла (слика 2.12), при чему је расута светлост у правцу упадне светлости највећег интензитета [92].



Слика 2.12. Шематски приказ расипања светлости у зависности од величине честице (модификовано из [84])

Фотон корелационом спектроскопијом се заправо мере временски зависне флукуације у интензитету расуте светлости честица услед њиховог спонтаног (Брауновог) кретања у течности, у веома кратким узастопним временским интервалима који износе неколико наносекунди или микросекунди. Промена у интензитету флукуације расуте светлости у функцији времена, назива се корелациона функција (слика 2.13).



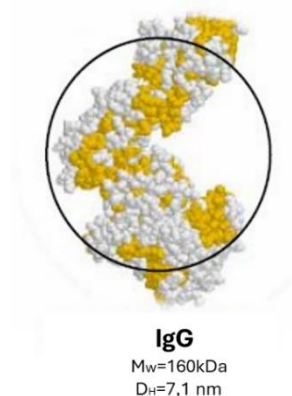
**Слика 2.13.** Утицај величине колоидних честица на емитовани сигнал расипања светлости у времену и корелациону функцију А) мале честице, Б) велике честице, В) Корелациона функција – објашњење (модификовано из [93,94])

Корелатор стално додаје и умножава флукуације у измереном интензитету расуте светлости и генерише (ауто)корелациону функцију за дати узорак. Аутокорелациона функција се потом „фитује“ у теоријску корелациону функцију  $g(\tau)$  преко једначине:

$$g(\tau) = e^{-2D\tau q^2} \quad (1)$$

где је  $D$  дифузиони коефицијент,  $q$  је апсолутна вредност вектора расуте функције и  $\tau$  је временски померај (*lag time*). На аутокорелациону функцију се примењује алгоритам, на основу чега се одређује величина честица и расподела честица по

величини. Величина честица која се добија овом техником позната је као хидродинамичка величина (пречник, дијаметар), (енглески: *Z-ave*, *Z-average size*, *Z-average mean*, *cumulant mean*). Код сферних честица је хидродинамичка величина честице једнака стварној величини честица, али се хидродинамички пречник може дефинисати и за честице неправилног облика као што су честице молекула IgG [94] (слика 2.14).



**Слика 2.14.** Шематски приказ хидродинамичког пречника молекула IgG;  $M_w$ -молекуларска маса (енглески: *molecular weight*);  $D_H$ -хидродинамички пречник (модификовано из [94])

Једначина којом се преводе временски зависне флукуације у интензитету расуте светлости тј. трансляторни дифузиони коефицијент ( $D$ ) у хидродинамички пречник честица ( $D_H$ ), је Штокс-Ајнштајнова (*Stokes – Einstein*) једначина:

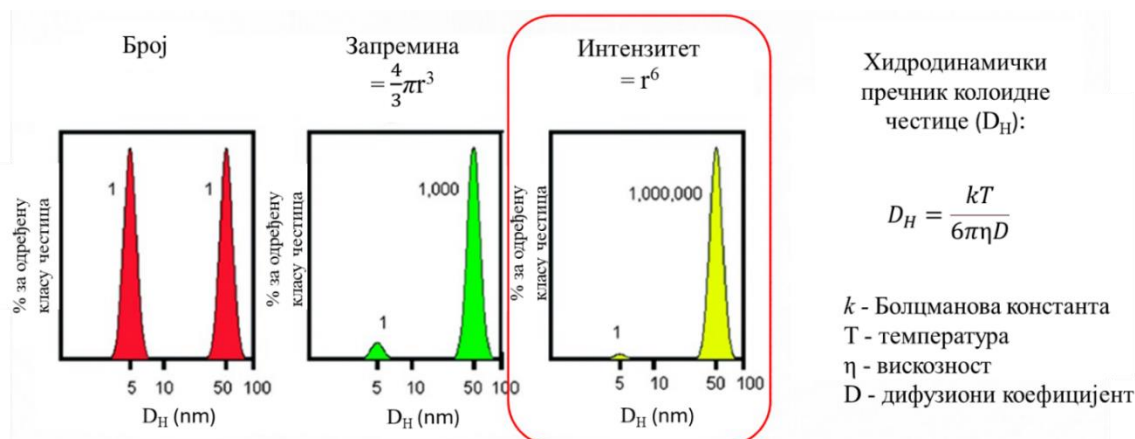
$$D = \frac{kT}{6\pi\eta D_H} \quad (2)$$

где је  $k$  Болцманова (*Boltzmann*) константа ( $1,38064852 \times 10^{-23}$  J/K),  $T$  апсолутна температура при којој се изводе мерења и  $\eta$  вискозност медијума у коме су честице суспендоване. Описане математичке једначине указују да резултати фотон корелационе спектроскопије зависе од неколико променљивих, укључујући вискозност растварача (дисперзанта), коришћени инструмент, температуру, индекс рефракције материјала итд. [84].

*Штокс-Ајнштајнова* једначина повезује дифузиони коефицијент честица са величином честица уколико су познати вискозност медијума у коме су честице суспендоване, и апсолутна температура при којој се изводе мерења.

Резултати анализе величине честица фотон корелационом спектроскопијом се приказују у облику дијаграма зависности интензитета расуте светлости од хидродинамичког пречника честица присутних у узорку. На основу ових података израчунавају се запремина и број честица одређеног дијаметра у анализираном узорку (слика 2.15).





**Слика 2.15.** Приказ резултата анализе величине честица фотон корелационом спектроскопијом: Детектована зависности интензитета расуте светлости од величине честица и израчуната запремина и број честица одређене величине (хипотетички дијаграми за узорак у коме се налазе сферне честице пречника 5 nm и 50 nm у једнаком броју) (модификовано из [95])

### 2.2.3. Математички модели који се примењују у анализи резултата фотон корелационе спектроскопије

За анализу величине честица и дистрибуције честица по величини уобичајено се користи кумулантна метода (енглески: CUMULANT) која је дефинисана у међународном стандарду о динамичком расипању светлости [96]. За одређивање величине честица кумулантном методом потребно је знати индекс рефракције дисперзанта и вискозитет дисперзионог медијума.

Поред могућности одређивања средње вредности пречника честица из кумулантне анализе, овом техником се може одредити и индекс полидисперзности (енглески: *polydispersity index*;  $PI$ ), бездимензиона величина, којом се добија дистрибуција честица по величини из кумулантне анализе.  $PI$  заправо описује математичко одступање стварне аутокорелационе функције од теоријске (фитоване) корелационе функције  $g(\tau)$ . Одступање аутокорелационе функције од фитоване корелационе функције се смањује са сужавањем расподеле честица по величини, тј. са смањењем  $PI$ . Индекс полидисперзности може имати вредност у интервалу од 0 до 1.

CUMULANT метод је заснован на претпоставци да је присутна само једна популација честица (мономодална), која има Гаусову расподелу око просечне величине честица. Уклапањем полинома трећег степена у логаритам корелационе функције интензитета добија се брзина распада  $\Gamma$  (1. кумулант).

Брзина распада је директно повезана са коефицијентом дифузије  $D$ :

$$\Gamma = Dq^2 \quad (3)$$

где је  $q$  је таласни вектор, који зависи од угла расејања. Виши редови резултата уклапања (2. и 3. кумулант) дају индекс полидисперзности узорка. Већина савремених PCS инструмената аутоматски врши CUMULANT анализу, јер је једноставна за имплементацију и брзо даје резултате [97].

Алтернативна метода за анализу аутокорелационе функције је CONTIN, која се заснива на инверзној Лапласовој трансформацији функције корелације интензитета добијене из PCS мерења. Функција корелације интензитета,  $g_2(\tau)$  је повезана са функцијом корелације електричног поља,  $g_1(\tau)$ , према следећој релацији:

$$g_2(\tau) = 1 + \beta |g_1(\tau)|^2 \quad (4)$$

где је  $\beta$  фактор повезивања. Функција  $g_1(\tau)$  се може изразити као суперпозиција експоненцијалних функција:

$$g_1(\tau) = \int_0^\infty A(D) e^{-\Gamma\tau} d\Gamma \quad (5)$$

где је  $\Gamma$  брзина распада повезана са коефицијентом дифузије  $D$  кроз релацију  $\Gamma = Dq^2$ . Да би се решила ова интегрална једначина и добила дистрибуција коефицијента дифузије  $A(D)$ , CONTIN метода користи регуларизацију, чиме се минимизује утицај шума у подацима [98].

CONTIN метода је идеална за хетеродисперзне, полидисперзне и мултимодалне системе који се не могу решити кумулантном методом. Резолуција за раздвајање две различите популације честица је приближно фактор пет или већа, а разлика у релативним интензитетима између две различите популације треба да буде мања од  $1:10^{-5}$ . Ова метода даје прецизнију карактеризацију величине честица у узорцима са комплексним дистрибуцијама. Међутим, имплементација ове методе захтева више времена и стручности у поређењу са CUMULANT методом, а резултати анализе су врло осетљиви на квалитет података.

CORENN метода (енглески: *Constrained Regularization for Exponential Non-Negative Networks*) представља напредну технику за анализу PCS података. Заснива се на решавању инверзних проблема регуларизацијом, користећи мреже са експоненцијалним функцијама које су подложне ограничењима да буду ненегативне и на тај начин омогућава врло прецизну и детаљну анализу комплексних, полимодалних дистрибуција величине честица [99].

#### 2.2.4. Примена у фармацеутским и биотехнолошким истраживањима

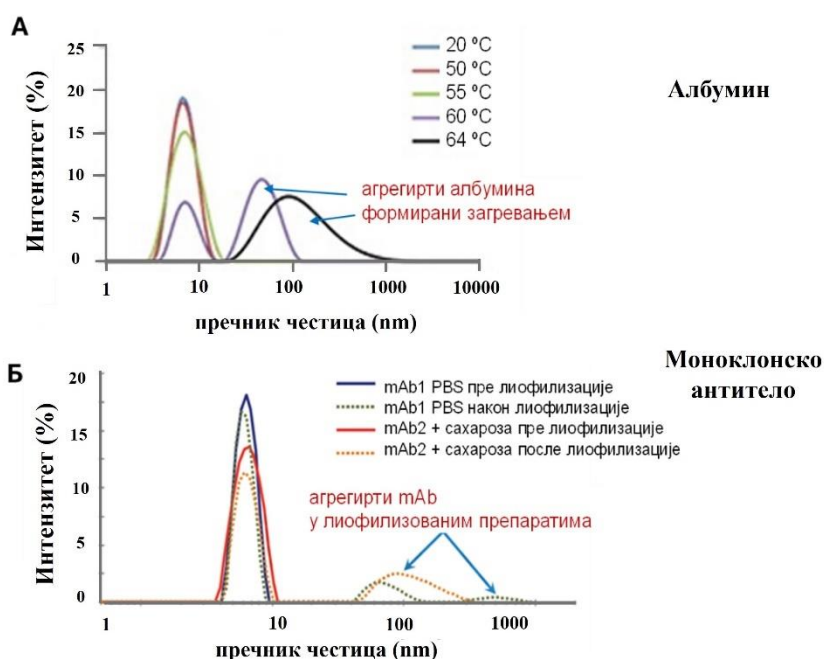
PCS је постала прихваћени аналитички метод у различитим истраживањима у оквиру природних, бимедицинских и наука о материјалима, као и индустријским процесима контроле квалитета [1]. На основу принципа рада, јасно је да је фотон корелациона спектроскопија најпогоднија метода за проучавање деградације макромолекула, њихове хомо- и хетеро-олигомеризације, полимеризације (укључујући и ензимски катализовану), као и формирање кластера у реалном времену.

Примери примене ове методе су бројни, као што су праћење: рН-зависне дисоцијације и хидролизе апоферитина [100], агрегације хуманог прионског протеина (PrP) након специфичног протеолитичког цепања или УВ зрачења [101-103], фазе кристализације протеина [104-106], густине ћелија у култури [107], формирања липидних нано-дискова [108] и кинетике фармацеутских препарата, попут инсулина [109]. Такође је показано да се може користити и за праћење кинетике реакције антиген-антитело [87], као и за праћење денатурације и термалне стабилности протеина у раствору, јер ова техника показује високу сензитивност за праћење малих промена у молекулској конформацији протеина [110].

Фотон корелациона спектроскопија у спрези са ексклузионом хроматографијом високе перформансе представља златни стандард за контролу стабилности



моноклонских антитела, посебно код појаве великих агрегата [111]. Ова техника се примењује и за испитивање других фармацеутских препарата, пре свега у контроли квалитета препарата за парентералну примену, где се мерењем просечне величине честица, расподеле величине честица, као и електрокинетичког (зета,  $\zeta$ ) потенцијала интравенских емулзија може пратити стабилност ових препарата [112]. Електрокинетички потенцијал је мера електричног потенцијала који се развија на површини честица у суспензији када се примени спољна електрична струја и представља меру колоидне стабилности. Висок електрокинетички потенцијал (позитиван или негативан) указује на то да су честице у суспензији добро одвојене једна од друге, што доводи до стабилније суспензије и спречава агломерацију честица. Супротно, уколико је електрокинетички потенцијал низак, честице лако агрегирају и формирају мање стабилне суспензије [84]. Агрегати различитих величина (од малих нпр. димери протеина, до оних видљивих голим оком), али и деградациони продукти протеина, могу да се формирају током процеса производње, чувања, транспорта или припрема за апликовање (слика 2.16). Формирање агрегата је најчешће индуковано променом температуре (неконтролисано загревање и смрзавање), променом рН пуфера, излагањем светлости, оксидацијом, механичким оштећењем током мешања, филтрирањем, хроматографских или других сепарација, интеракцијом са деловима опреме од челика, гуме, стакла, силикона или других материјала, интеракцијом са растварачима. Овакви агрегати могу да покрену нежељене реакције у организму и њихова детекција је саставни део анализе квалитета у савременим биотехнолошким процесима добијања природних или рекомбинантних протеина.



**Слика 2.16.** Детекција агрегата у препарату албумина применом фотон корелационе спектроскопије А) након загревања и Б) препарата моноклонских антитела након лиофилизације (модификовано из [113])

Графици приказују зависност интензитета расуте светлости од пречника честица.

Фотон корелациона спектроскопија се користи и за одређивање величине капи у микроемулзијама као носачима лекова, како за оралну [114], тако и за интравенску примену [115], за одређивање величине липидних наночестица [116], као и наночестица сребра [117]. Величина честица оксида гвожђа стабилованих полисахаридом, које се користе као контрастна средства за магнетну резонанцу је такође одређивана помоћу

фотон корелационе спектроскопије [118]. Проучавани су и процеси агрегације серумских протеина са честицама композитних материјала који се користе за испоруку лекова [119].

Фотон корелациона спектроскопија се може применити за праћење физичке стабилности липозома (честица од фосфолипидног двослоја) као носача биоактивних једињења, при чему пораст величине честица током складиштења упућује на агрегацију честица током времена. На тај начин се одређује рок трајања формулација на бази липозома при складиштењу под одређеним условима [120,121].

Значајну примену фотон корелациона спектроскопија нашла је и у биомедицинским истраживањима. Праћење корона ефекта након примене албуминских наночестица *in vivo* је вршено применом ове методе, што је од кључног значаја за терапијску примену наночестица, како би честице могле да дођу до свог циљног места у организму [122]. Мерење величине субмикронских честица присутних у синовијалној течности оболелих након реконструкције/замене зглоба је један од главних параметара за праћење стања након интервенције, како не би дошло до инфламације, што се такође може пратити применом фотон корелационе спектроскопије [123]. Фотон корелационом спектроскопијом је праћена и величина PF4 - хепарин комплекса, која је од изузетног значаја за патогенезу хепарин индуковане тромбоцитопеније [124].

## 2.2.5. Примена фотон корелационе спектроскопије у дијагностичке сврхе

PCS је техника која има значајан потенцијал за примену у дијагностици болести људи и животиња, али је њена примена у клиничкој дијагностици још увек у фази истраживања и развоја. Проблем у оптимизовању ове методе за употребу у клиничкој дијагностици лежи у сложености и хетерогености биолошких узорака, као што су крв, урин или ткива, где присуство различитих компоненти може ометати прецизну анализу и довести до компликованих корелационих функција [119].

Ипак, рађене су студија које су се бавиле анализом компоненти крвног серума помоћу фотон корелационе спектроскопије. Показано је да између узорака крвне плазме здравих давалаца крви и крвне плазме особа са онколошким обољењима постоји разлика у односу на интензитет расуте светлости на молекулима албумина и глобулина. Показана разлика је повезана са повећањем релативне концентрације албумина и смањењем глобулина у онколошким стањима [125]. Слична истраживања су показала да се PCS може користити за идентификацију особа у ризику од развоја онколошких обољења анализом крвног серума, праћењем повећања процента једињења са малом молекулском масом (величине 1–10 nm) и смањења процента великих протеина (11–30 nm) и њихових агломерата у код оболелих [125]. Поред тога, разматрају се могућности употребе динамичког расејања као дијагностичког алата за анализу ризика од настанка дијабетеса и кардиоваскуларних болести, као и за одређивање величине честица крвног серума и његових промена у процесу деградације протеина. Студије су такође показале да се ова метода може користити за детекцију маркера карцинома коришћењем специјално припремљених сонди на бази наночестица злата или других метала [119].

PCS се користи за анализу агрегата протеина као што су амилоидни плакови у мозгу који су повезани са болестима као што су Алцхајмерова и Паркинсонова болест, што може помоћи у раном откривању и праћењу прогресије ових болести [126].

Иако PCS нуди значајне предности у анализи динамичких процеса у биолошким узорцима и има велики потенцијал за примену у дијагностици, потребно је развити стандардизоване протоколе за њену употребу у клиничкој пракси.

### 2.2.6. Фактори који утичу на резултат мерења фотон корелационом спектроскопијом

Како би се добили поуздани резултати мерења потребно је оптимизовати начин припреме узорка, тако да конформација и колоидна стабилност препарата остану ненарушене. Наиме, познато је да се конформационе промене у молекулима имуноглобулина могу индуковати екстремним вредностима рН раствора, променама пуферских система, температуре, али и да могу настати као последица интеракције са антигенима или (не)специфичне интеракције са другим макоромолекулима [127,128].

Уколико се узорак разблажује, неопходан је адекватан избор растварача, јер разлике у индексу преламања и вискозности различитих растварача могу утицати интерпретацију резултата [75]. Растварач мора бити ефикасан у дисперговању честица и потребно је да осигура довољну колоидну стабилност током мерења. Такође, растварач не би требао да мења својства узорака. Уколико постоји више адекватних растварача, треба изабрати растварач који даје највећи контраст између узорка и растварача, односно највећу разлику у индексу преламања, јер ће се на тај начин добити најбољи сигнал при анализираној концентрацији узорка [75].

За што прецизније мерење, неопходно је оптимизовати концентрацију узорка. Ова концентрација зависи од фактора који се односе на инструмент (нпр. запремина и угао расејања светлости, снага ласера, осетљивост детектора) и својства материјала (нпр. молекулска маса, компактност) честица. Већа концентрација узорка доводи до вишеструког расејања, где расејана светлост једне честице ступа у интеракцију са другим честицама пре него што стигне до детектора и губи интензитет. Као резултат тога, добијена величина је вештачки мања. Насупрот, коришћење превише разблажених узорака неће створити довољно сигнала расуте светлости за анализу [75].

Узорци за PCS мерења треба да буду хомогени и без замућења. Замућеност, контаминација или велике честице могу значајно утицати на прецизност мерења, јер могу изменити путању ласерског зрака пре него што прође кроз центар ћелије за мерење и на тај начин доведе до непрецизних мерења и анализе података. Овај ефекат узрокује да већ расута светлост буде додатно расејана пре него што стигне до детектора, чиме се изобличава сигнал. Како би се овај проблем минимизовао, узорак је потребно центрифугирати, разблажити или филтрирати [24]. Међутим, филтрација може изменити дистрибуцију честица и/или уклонити агломерате, што може потенцијално утицати на добијене резултате. Такође, промена концентрације протеина разблаживањем може изазвати дисоцијацију реверзибилних агломерата [24]. Резултати мерења могу бити непрецизни у узорцима у којима су присутни велики агрегати. Агломерација доводи до формирања већих структура и може довести до ширења и деформације врхова у дистрибуцији величине честица. Као резултат тога, појављују се шири и мање прецизни пикови, што отежава интерпретацију добијених сигнала. Такође, агломерати могу маскирати присуство мањих честица у узорку, односно могу смањити осетљивост детектора [75].

Обојени узорци могу да апсорбују светлост у одређеном опсегу таласних дужина, па самим тим је интензитет расуте светлости мањи и измерена величина честица је мања од стварне [75].

Честице неправилног облика обично показују веће хидродинамичке пречнике у поређењу са сферним честицама еквивалентног пречника. Такође, честице неправилног облика могу показати асиметрично понашање у дифузији светлости у поређењу са сферним честицама што може утицати на начин интеракције са светлошћу и расподелу интензитета расуте светлости. На пример, честица са оштрим ивицама или неправилним

површинама могу стварати додатне светлосне ефекте који могу утицати на прецизност добијених резултата [84]. Такође, већина комерцијално доступних апарата је опремљена софтверима који структуру колоидних честица апроксимирају као сферу. То је одговарајући приступ за анализу нпр. молекула албумина чија структура се може апроксимирати на овај начин. Међутим, за анализу молекула имуноглобулина, због њихове специфичне структуре, оваква апроксимација није увек одговарајућа.

На резултате анализе утиче трајање мерења, реолошка својства (вискозитет) узорка као и математички модели или алгоритми који су коришћени за анализу резултата.

Због свега наведеног, препоручено је да се, за анализу присуства протеинских агрегата, PCS користи у комбинацији са другим техникама (различитим типовима хроматографија и електрофореза, UV-VIS спектроскопијом, FTIR и Рамановом спектроскопијом, различитим микроскопским методама, итд.) [2, 25-27,24].

### **2.2.7. Предности фотон корелационе спектроскопије методе у анализи величина имунокомплекса**

Велика предност PCS у односу на методе које се иначе користе за анализу величина имунокомплекса је у томе што се релативно брзо изводи, не захтева посебну припрему узорка, показује широку примењивост за проучавање различитих типова протеина, а након анализе узорак се може користити за друге анализе. Такође, потребна је мала количина узорка, а омогућени су широк опсег мерења величине честица и праћење дистрибуције величине честица у реалном времену, као одговор на различите спољашње стимулусе, као што су промене рН, температуре или концентрације. Ова карактеристика PCS методе је корисна за проучавање динамичког понашања колоидних система и разумевање њихове стабилности и реактивности у различитим условима.

Још једна битна предност фотон корелационе спектроскопије јесте исплативост, јер у поређењу са другим методама за анализу величине честица, као што је на пример електронска микроскопија, ова метода није превише захтевна у смислу инструментације и изводи се изузетно брзо, што је чини погодном за примену у широком спектру научних области и индустрији за рутинску анализу величине честица и на већем броју узорака. Упоредни приказ метода које се користе за анализу величина имунокомплекса приказан је у табели 2.4.

Табела 2.4. Упоредни приказ метода које се користе за анализу величина имунокомплекса

Параметри/Метода	Фотон корелациона спектроскопија	Ультрацентрифугирање на градијенту сахарозе	Гел филтрација на ниском притиску	SEM и AFM
Трајање анализе	20 минута	Припрема градијента, ултрацентрифугирање и анализа фракција: 2 дана	Релативно спор процес до неколико сати	Припрема узорака и снимање: 2 дана
Припрема узорка и опреме	Минимална, углавном се узорци анализирају у свом нативном облику	Припрема узорка је минимална; Формирање градијента густине и скупљање фракција је технички и временски захтевно	Припрема узорка је минимална; Припрема колоне, наношење узорка и елуирање и анализа фракција су временски захтевни	Специфична припрему узорка: фиксација, дехидратација (AFM) и додатно облагање ( <i>sputter-coating</i> ) за SEM
Резолуција и сензитивност	Висока сензитивност	Умерена	Умерена	Висока резолуција
Динамичке информације	Пружа динамичке информације о дистрибуцији величине честица, погодна за праћење промена током времена	Омогућава статичка мерења након завршетка процеса ултрацентрифугирања	Омогућава статичка мерења у дискретним временским тачкама током процеса одвајања	Обезбеђују статичне снимке слике у једној временској тачки
Запремина узорка	Мала запремина узорка (500 $\mu$ L)	Веће запремине узорка (>1mL)	Веће запремине узорка (>1mL)	Минимална количина узорка (10 $\mu$ L)
Цена апарата и цена анализе и комплексност поступка мерења	Умерена цена и једноставност рада	Умерена до висока цена; Захтева специјализовану опрему	Умерени трошкови и умерена сложеност у погледу рада	Висока цена, неопходан је обучени оператор због сложеног рада и одржавања опреме

### 3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Циљ ове докторске дисертације је да се испита хипотеза примене фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса, тј. честица у њиховом саставу, у дијагностици болести за чији су настанак и прогресију укључени имунокомплекси.

У овој докторској дисертацији биће анализирани имунокомплекси здравих особа и особа са РА. Иако се у РА имунокомплекси стварају и акумулирају у синовијалној течности, у овом истраживању биће анализирани имунокомплекси у серумима периферне крви (СИС), који садрже у себи и имунокомплексе који потичу из периферних ткива, и као такви представљају одговарајући модел за изучавање имунокомплекса када их није могуће изоловати директно са места инфламације.

Циљ ове дисертације је да се на основу резултата анализе величине колоидних СИС честица фотон корелационом спектроскопијом одреди дистрибуција њихове величине која је карактеристична за СИС здравих особа, тј. да се формира референтни систем на основу кога ће бити показана промена дистрибуције величина колоидних честица СИС у РА. На овај начин би се потврдила могућност примене ове методе за анализу величине честица у саставу природно формираних имунокомплекса.

У овој докторској дисертацији експериментални део реализован је кроз три главне фазе:

**I) Анализа величине колоидних честица нативних имуноглобулина IgG, *in vitro* аналога имунокомплекса и *in vitro* формираних имунокомплекса која подразумева:**

- Изоловање IgG из периферне крви здравих особа;
- Формирање *in vitro* аналога имунокомплекса агрегирањем (загревањем) нативних IgG;
- *In vitro* формирање имунокомплекса између IgG и моноклонских антитела миша специфичних за к лаке ланце имуноглобулина човека;
- Анализа величине нативних и агрегираних IgG уобичајеним методама анализе величине имунокомплекса: ултрацентрифугирањем, гел филтрацијом и микроскопским методама (SEM и AFM);
- Мерење величине колоидних честица у препаратима нативних и агрегираних IgG и *in vitro* формираних имунокомплекса фотон корелационом спектроскопијом и поређење добијених резултата са резултатима добијеним применом других метода анализе величине и имунокомплекса;
- Одређивање вредности  $\zeta$  (електрокинетичког) потенцијала, као мере колоидне стабилности, нативних и агрегираних IgG;
- Поређење резултата мерења величине колоидних честица у препаратима нативних и агрегираних IgG фотон корелационом спектроскопијом са величином колоидних честица у препаратима нативног и агрегираног албумина човека као модела глобуларног протеина.

**II) Анализа величине колоидних честица у СИС здравих особа која подразумева:**

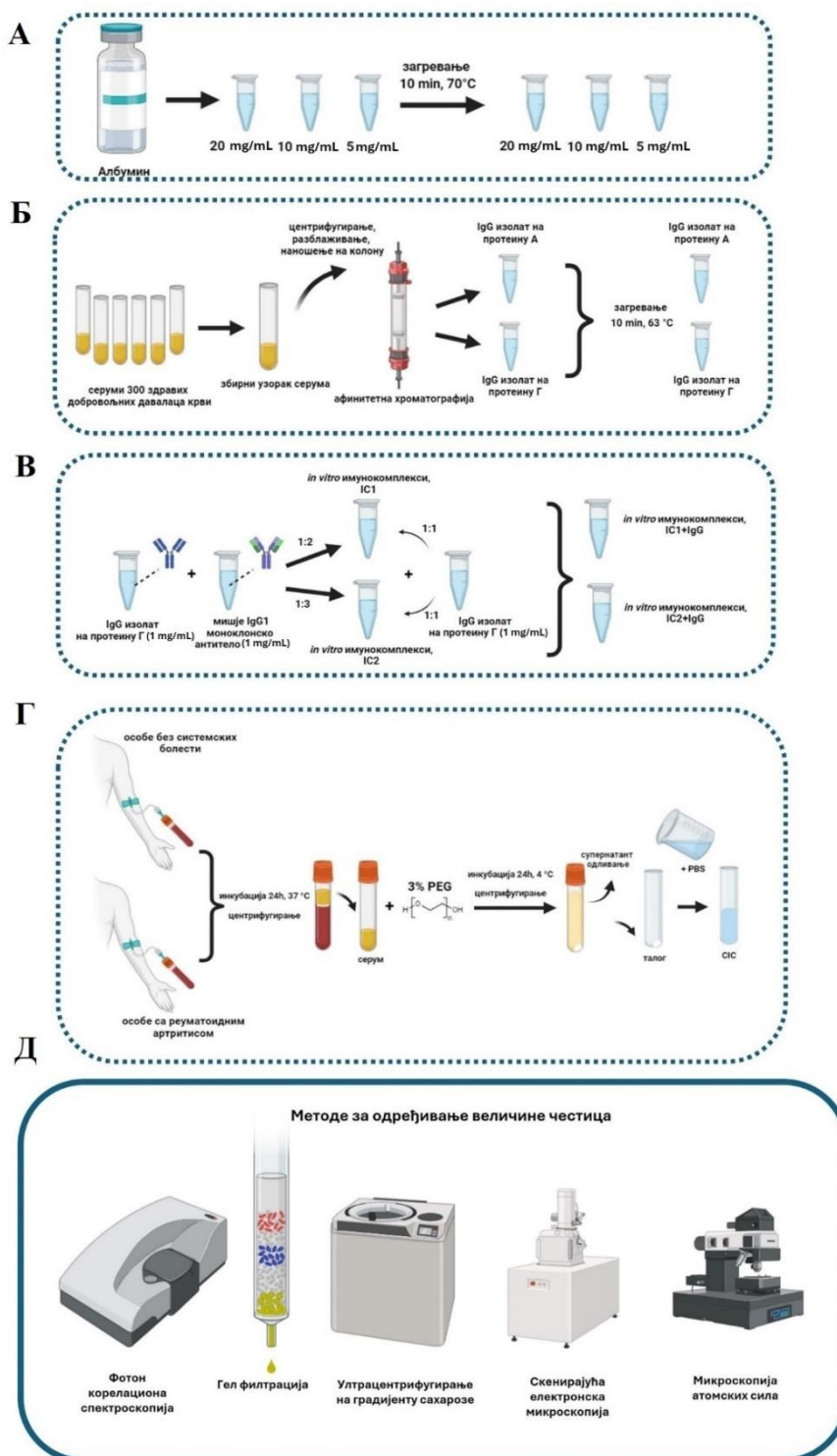
- Изоловање СИС здравих особа преципитацијом уз примену полиетилен гликола и анализа садржаја класа и подкласа имуноглобулина у изолованим СИС;
- Анализа СИС здравих особа ултрацентрифугирањем, гел филтрацијом и микроскопским методама (SEM и AFM);

- Мерење величине колоидних честица СИС здравих особа фотон корелационом спектроскопијом уз поређење са резултатима добијеним ултрацентрифугирањем, гел филтрацијом и микроскопским методама (AFM и SEM) нативних и агрегираних IgG;
- Одређивање вредности  $\zeta$  (електрокинетичког) потенцијала СИС здравих особа.

**III) Анализа величине колоидних честица у СИС особа са РА као модел болести посредоване имунокомплексима која подразумева:**

- Изоловање СИС особа са РА преципитацијом уз примену полиетилен гликола и анализа садржаја класа и подкласа имуноглобулина у изолованим СИС;
- Анализа СИС особа са РА ултрацентрифугирањем, гел филтрацијом и микроскопским методама (SEM и AFM);
- Мерење величине колоидних честица СИС особа са РА фотон корелационом спектроскопијом и поређењем са резултатима ултрацентрифугирања, гел филтрације и SEM нативних и агрегираних IgG;
- Дефинисање вредности  $\zeta$  (електрокинетичког) потенцијала СИС особа са РА.

Шематски приказ експерименталног дела докторске дисертације приказан је на слици 3.1.



Слика 3.1. Шематски приказ експерименталног дела докторске дисертације

А) Препарат нативног албумина различитих концентрација и њихово агрегирање топлотом; Б) Изоловање IgG из серума добровољних давалаца крви афинитетном хроматографијом и агрегирање топлотом; В) *In vitro* формирање имунокомплекса између IgG и моноклоноских антитела миша специфичних за к лаке ланце имуноглобулина човека у различитим односима; Г) Изоловање C1C из серума особа са РА и здравих особа преципитацијом полиетилен гликолом; Д) Методе које су коришћене за анализу величине честица узорка добијених различитим поступцима (А, Б, В и Г) (креирано помоћу BioRender.com)



## 4. Експериментални део

### 4.1. Материјали

#### 4.1.1. Серуми периферне крви здравих добровољних давалаца крви

У овом истраживању, као биолошки материјал коришћени су серуми периферне крви 300 добровољних давалаца. Серуми су сакупљени на Институту за трансфузиологију и хемобиологију Војномедицинске академије у Београду, у периоду мај-јун 2022. године. Ови узорци представљају отпадни биолошки материјал који заостаје након анализа урађених за потребе процене здравственог статуса давалаца. Узорци периферне крви узети су након добијања писмених информисаних пристанака и експерименти су урађени у складу са Етичким кодексом Светског медицинског удружења (Декларација Хелсинки) и одобрен од Етичког комитета Војномедицинске академија (Етичка одлука 17/2020; за здраве даваоце крви). Просечна старост добровољаца је била  $38 \pm 11$  година. Од серума периферне крви 300 добровољних давалаца крви направљен је збирни узорак серума из којих је изолован IgG, који је даље коришћен за *in vitro* формирање агрегата IgG и имунокомплекса.

#### 4.1.2. Серуми периферне крви особа са РА и здравих особа

У овом истраживању као биолошки материјал коришћени су и серуми периферне крви 30 пацијената са РА који су стационарно лечени у Институту за реуматологију, Београд, Србија. Ниво RF и АСРА у серумима испитаника, као и брзина седиментације еритроцита, концентрација Це - реактивног протеина (енглески: *c-reactive protein, CRP*), и степен активности болести (енглески: *disease activity score-28, DAS 28*) су одређени на Институту за реуматологију у Београду. Из овог Института су добијени и подаци о терапији специфичној за РА коју су испитаници примали у време узимања крви за потребе ове студије. Ниједан од пацијената није лечен терапијским моноклонским антителима. Индивидуални подаци о старости и полу испитаника, нивоу серумских RF и АСРА, брзини седиментације еритроцита, нивоу CRP и DAS 28, како и примљеној терапији су приказани у табели П1, у Прилогу ове дисертације.

Осим узорака серума особа са РА у овом раду су коришћени и серуми 30 здравих особа који по старости одговарају испитаницима са РА, и који су формирали контролну групу ове студије. Испитаници који су формирали контролну групу нису имали документоване системске болести и акутне инфекције најмање месец дана пре узимања крви. Њихова старост и пол су дати у табели П2, у Прилогу ове дисертације.

Сви узорци периферне крви здравих донора узети су након добијања писмених информисаних пристанака, а експерименти су урађени у складу са Етичким кодексом Светског медицинског удружења (Декларација Хелсинки) и одобрени од Етичког комитета Стоматолошког факултета Универзитета у Београду (Етичка одлука бр. 36/7;12. април 2017).

### 4.1.3. Албумин

У раду је коришћен препарат 22% албумина за интравенску примену (комерцијални препарат, Bovine albumin 22%, CE-IMMUNODIAGNOSTIKA GmbH, Немачка).

## 4.2. Методе

### 4.2.1. Изоловање крвног серума

Појединачни узорци серума добијени су спонтаном коагулацијом крви током 24 h на 37 °C након чега је течна фаза издвојена центрифугирањем на 22 °C, при 1257 x g током 10 min. Један део серума (запремине од 1 mL) је одмах коришћен за изоловање С1С (описано у одељку 4.2.6), док је преостали део серума замрзнут на -20 °C за даље анализе.

### 4.2.2. Изоловање IgG из серума афинитетном хроматографијом

IgG је изолован из узорка збирног серума 300 здравих особа афинитетном хроматографијом на колони са протеином А (HiTrap Protein A HP, 1 mL columns, Cytiva) и на колони са протеином Ге (HiTrap Protein G HP, 1 mL columns, Cytiva). Збирни серум је најпре центрифугиран на 22 °C на 3000 × g у трајању од 10 min, затим је разблажен у односу 1:2 изотоничним фосфатним пуфером концентрације 10 mM, pH 7,2-7,4, (енглески: *phosphate buffered saline, PBS*).

Пре почетка хроматографије афинитетни матрикси у хроматографским колонама су еквилибрисани PBS пуфером, а затим је на колоне намошен узорак разблаженог серума. Након тога је кроз колону пропуштан PBS у запремини која одговара 5 запремина колоне. На овај начин су уклоњени протеини који се нису везали за афинитетни матрикс. Елуирање протеина везаних за матрикс је рађено 0,1 M глицинским пуфером pH 2,5. Непосредно након елуирања, низак pH елуента је неутрализован додавањем 40 µL 1M TRIS pH 8 на 1 mL узорка. Измена пуфера је рађена пропуштањем елуата кроз колону (запремине 5 mL) напуњену матриксом за гел филтрацију Sephadex G-25 (опсег раздвајања: 1-5 kDa за глобуларне протеине; Cytiva, САД), који је пре измене пуфера био еквилибрисан PBS пуфером.

### 4.2.3. Одређивање концентрације протеина

Концентрација протеина у свим узорцима је одређена комерцијалним тестом бичинхонинске киселине (енглески: *Bicinchoninic Acid, BCA*)(BCA Protein Assay Kit, Pierce, САД) а тест је рађен по упутству произвођача. Као протеински стандард коришћен је раствор говеђег албумина у опсегу концентрација од 0,062 до 1000 mg/mL. Као слепа проба коришћен је PBS. Тест је извођен у микротитарским плочама са 96 места, при чему је на 25 µL стандардних раствора и С1С узорака додавано 200 µL радног ВСА реагенса. Реакциона смеша је инкубирана 30 min на 37 °C, а на основу читаних вредности апсорбанце на 540 nm таласне дужине ( $A_{540}$ ) из једначине праве израчунате су концентрације протеина у узорцима.

#### 4.2.4. Електрофореза протеина у гелу полиакриламида са додатком натријум-додецил-сулфата

Чистоћа препарата серума IgG добијених афинитетним изоловањем на протеину А и протеину Ге проверена је дисконтинуираном електрофорезом на гелу од полиакриламида са додатком натријум-додецил-сулфата (енглески: *SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*) у нередукуюћим условима [88]. Електрофореза је рађена на „SE 260 Mighty Small II Vertical Slab Electrophoresis Unit“ (GE HealthCare LifeScience, САД) апарату за вертикалну SDS-PAGE са хлађењем. Електрофореза је рађена у 10% геловима дебљине 1 mm, са 10 места за узорке. На гел је наносено 10 µg протеина по узорку. На сваки гел су поред узорака, наносени протеински маркери познатих молекулских маса у опсегу од 10-250 kDa (PageRuler™ Plus, Thermo Scientific, Rockford, IL, САД). Електрофоретско раздвајање је извођено при константној јачини струје од 40 mA уз непрестано хлађење. По завршетку електрофорезе протеинске фракције су визуелизоване бојењем реагенсом Комаси плаво (енглески: *Coomassie brilliant blue, CBB*), након чега је вишак боје уклоњен раствором метанола и сирћетне киселине.

#### 4.2.5. Формирање агрегата протеина топлотом

##### 4.2.5.1. Агрегација албумина топлотом

Албумин за интравенску примену (22%) је разблажен у физиолошком раствору (Natrii chloridi infundibile, 9 g/L; Хемофарм, Србија) до концентрација од 20, 10 и 5 mg/mL и агрегиран загревањем на 70 °C (температура неопходна да би се овај протеин успешно денатурисао и агрегирао [129]) у трајању од 10 min. Ефикасност денатурације и агрегације албумина је процењена на основу мерења апсорбанције раствора на 350 nm ( $A_{350}$ ), након чега су неагрегирани (нативни) и агрегирани албумин анализирани фотон корелационом спектроскопијом (описано у 4.2.10).

##### 4.2.5.2. Агрегација IgG топлотом - Формирање *in vitro* аналога имунокомплекса

IgG који је афинитетно изолован на протеину А или протеину Ге је разблажен у PBS пуфером до концентрације од 1 mg/mL, а затим агрегиран стандардним поступком, загревањем на 63°C у трајању од 10 min. Ова једноставна метода је изабрана, јер је познато да молекули IgG агрегирају на температурама вишим од 50 °C и да на тај начин формирају *in vitro* аналоге имунокомплекса [88,130]. Ефикасност денатурације и агрегације је процењена на основу мерења апсорбанције на 350 nm ( $A_{350}$ ), након чега су неагрегирани (нативни) IgG и IgG агрегати анализирани фотон корелационом спектроскопијом (описано у 4.2.10).

#### 4.2.6. *In vitro* формирање имунокомплекса

*In vitro* имунокомплекси су формиран у реакцији афинитетно изолованог IgG и моноклонског антитела миша специфичног за к лаке ланце имуноглобулина човека. Мишје IgG1 моноклонско антитело, клон 44, је добијено у лабораторији др Љиљане Димитријевић, у Институту за вирусологију, вакцине и серуме, Торлак.

Да би се анализирао ефекат односа антигена и антитела на величину имунокомплекса, IgG (антиген) и моноклонско антитело реактивно са к лаким ланцима су разблажени у PBS пуферу до концентрације 1 mg/mL и помешани у запреминском односу 1:2 (*in vitro* имунокомплекси означени како IC1) и 1:3 (имунокомплекси означени како *in vitro* IC2) и анализирани фотон корелационом спектроскопијом (описано у 4.2.10).

Да би се пратила динамичка промена величине имунокомплекса зависно од промене количине конституената, након анализе фотон корелационом спектроскопијом у IC1 и IC2 је додат је антиген (IgG концентрације 1 mg/mL) у запреминском односу 1:1 са IC1 и IC2, а новоформирани имунокомплекси (IC1+IgG и IC2+IgG) су анализирани истом методом.

#### 4.2.7. Изолација CIC из серума здравих особа и серума особа са РА

CIC из серума здравих особа и особа са РА су изоловани преципитацијом уз примену PEG релативне молекулске масе 6000 [131,132] коришћењем финалне концентрације PEG 3% (v/v). CIC су исталожени додавањем 2 mL 4,5% PEG у 1 mL свежег серума. Ова суспензија је остављена преко ноћи на 4 °C, а затим центрифугирана 20 min на 1250 x g, на 4 °C. По завршеном центрифугирању супернатант је одливен, а вишак течности из епрувете са талогом је уклоњен капиларно филтер папиром. Талог је ресуспендован у 1 mL PBS пуфера и ниво имунокомплекса одређен је мерењем A<sub>350</sub> ресуспендованог PEG талоба на спектрофотометру Ultrospec 3300 pro (Amersham Bioscience, Uppsala, Шведска). Након тога, по 100 µL сваког од CIC узорка здравих особа и РА пацијената су коришћени за прављење збирних CIC узорака обе групе испитаника, док је преостала количина коришћена за анализе појединачних CIC. Сви узорци су до даље анализе чувани на -20 °C.

#### 4.2.8. Одређивање концентрације имуноглобулина имунонефелометријском методом

Концентрација IgG, IgA и IgM у збирним серумима и концентрација укупног IgG и IgG подкласа, IgA и IgM у препаратима IgG изолованим афинитетном хроматографијом одређена је имунонефелометријском методом (користећи рутинску методу са N антисерумима за IgG, IgA, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 примењену на Siemens BN Pro Spec Sistem).

#### 4.2.9. Дот блот анализа

Дот блот анализа је коришћена за детекцију присуства класа имуноглобулина (IgG, IgA, и IgM) и подкласа IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) у препаратима IgG афинитетном хроматографијом (4.2.2), као и за семиквантитативно одређивање садржаја укупног IgG, IgA и IgM и подкласа IgG у свим узорцима CIC (4.2.7) [133,134]. Као позитивна контрола и стандард за квантификацију садржаја имуноглобулина у CIC служио је разблажени збирни серум здравих особа.

Дот блот анализа је изведена тако што је по 3 µl сваког узорка, у одговарајућем разблажењу, додато на нитроцелулозну мембрану. Након сушења на собној температури, неспецифично везивање је блокирано инкубирањем мембране са 3% говеђим албумином раствореним у 50 mM TRIS пуферу, pH 7,5 са 100 mM NaCl (енглески: *TRIS buffered saline, TBS*) у који је додат нејонски сурфактант Tween 20 у концентрацији од 0,01% (TBS-Tween). Након овога, мембране су испране 3 пута по 10 min коришћењем TBS-Tween раствора, а затим су инкубирани 1 h на собној температури са поликлонским антителима козе коњугованим пероксидазом специфичним за хумане IgM, IgG или IgA (Boster Biological Technology Co., Ltd., Pleasanton, CA, САД) или моноклонским антителима миша коњугованим пероксидазом, специфичним за IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (HP 6186, HP 6014, HP 6080, HP 6206, Sigma Nordic, Холандија). Антитела су растварана у 1% говеђем албумину у TBS-Tween. Након инкубације, мембране су испране 3 пута по 10 min раствором TBS-Tween, и једанпут TBS, у трајању од 5 min. На мембране је затим

додат супстрат пероксидазе (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent) који у присуству  $H_2O_2$  прелази у једињење које је луминисцентно. Интензитет хемилуминисценце је прочитан ChemiDoc 2.0 апарату (Bio Rad Laboratories, Inc, САД) и квантификован дензитометријски коришћењем Image Master TotalLab softvera (GE HealthCare LifeScience).

Резултати квантификације су исказани као IgA, IgG и IgM индекси, и као IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 индекси који представљају интензитет дот блот сигнала одговарајућег типа или изотипа имуноглобулина нормализован у односу на контролу (збирни узорак серума разблажен до концентрације протеина од 2,1 mg/mL, што је одговарало средњој концентрацији протеина С1С здравих особа).

#### 4.2.10. Одређивање величине честица фотон корелационом спектроскопијом

Просечна величина честица, тј. просечан хидродинамички пречник, (енглески: *intensity-weighted mean diameter, z-average*) је одређена фотон корелационом спектроскопијом коришћењем уређаја Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Велика Британија) повезаним са софтверским пакетом Zetasizer software верзија 7.03, који се налази на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду. Мерни опсег инструмента је од 0,6 nm до 6  $\mu$ m. Мерења су рађена на температури од 25 °C, при углу расипања од 173°, и уз примену начина мерења означеног као *automatic sampling time mode*. Током мерења коришћен је RI индекс воде од 1,33, с обзиром на чињеницу да раствори протеина ниске концентрације (какви су С1С) имају индекс преламања близак индексу преламања воде [135]. Анализирана је величина честица следећих узорака: нативни молекули IgG и албумин, агрегирани албумин, честице у саставу *in vitro* аналога имунокомплекса (агрегирани IgG), *in vitro* формиран имунокомплекс и С1С здравих особа и особа са РА

За анализу испитиваних узорака коришћена је пластична полистиренска кивета за дијаметра 10 mm. Сви узорци су непосредно пре анализе центрифугирани 10 min, на 3000 rpm, на 4 °C, да би се уклонили евентуални неспецифично формиран велики агрегати. Након центрифугирања, сакупљени су супренатанти и анализирани неразблажени, уз употребу одговарајућих оперативних процедура (енглески: *Standard operating procedures, SOP*). Математичком обрадом криве (кумулантна анализа) софтвером којим је снабдевен апарат Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Велика Британија), резултати су представљени као појединачни графикони зависности интензитета расејаног светла и величине честица нативних IgG и агрегираних IgG, албумина и агрегираног албумина, *in vitro* формираног имунокомплекса и збирних и индивидуалних С1С узорака. За сваки узорак мерење је поновљено десет пута.

#### 4.2.11. Мерење $\zeta$ потенцијала

$\zeta$  потенцијал нативних молекула албумина и IgG, агрегираног албумина IgG, *in vitro* аналога имунокомплекса (агрегирани IgG), и С1С здравих особа и особа са РА анализирана је фотон корелационом спектроскопијом на Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Велика Британија) апарату на 25 °C, коришћењем савијених (енглески: *folded*) капиларних ћелија (DTS 1060, Malvern Instruments, Велика Британија) за једнократну употребу. Јачина примењеног поља у току мерења износила је 20 V/cm. За сваки узорак мерење  $\zeta$  потенцијала је поновљено десет пута уз коришћење начина мерења означеног као *auto mode*.

#### 4.2.12. Гел филтрација

Величина агрегираног албумина, *in vitro* аналога имунокомплекса (агрегираних IgG) и индивидуалних СИС је одређена и гел филтрацијом на Sephacryl S-300 матриксу (опсег раздвајања: 10-1500 kDa за глобуларне протеине и 1-400 kDa за декстран; Cytiva, САД). Пре почетка хроматографије, колона пречника 1 cm и дужине 15 cm је напуњена матриксом који је еквилибрисан пропуштањем PBS раствором. На припремљену гел филтрациону колону су наношени узорци у запремини од 500  $\mu$ L. Концентрација протеина у узорцима албумина је била 5 mg/mL, IgG 1 mg/mL, док је у узорцима СИС је била 2 mg/mL. Након уласка узорака у колону, протеини су раздвајани пропуштањем PBS кроз колону, константним протоком од 0,33 mL/min. Елуент је у порцијама (фракцијама) од 1,5 mL сакупљан до укупне запремине од 9 mL. За сваку фракцију измерена је апсорбанција  $A_{280}$  и  $A_{350}$  на спектрофотометру Ultrospec 3300 pro (Amersham Bioscience, Upsala, Шведска). Присуство IgG, IgA и IgM у елуираним фракцијама је анализирано дот блотом.

#### 4.2.13. Ултрацентрифугирање на градијенту сахарозе

Величина нативног и агрегираног албумина, нативног и агрегираног IgG и СИС здравих особа и особа са РА је одређивана и ултрацентрифугирањем на континуираном градијенту сахарозе, у опсегу концентрације од 10 до 37% [136].

Градијент је прављен у поликарбонатним епруветама за ултрацентрифугирање (Beckman Coulter) запремине 32 mL, за ротор Type 70 Ti препаративне ултрацентрифуге (Optima XE Ultracentrifuge, Beckman Coulter). У епрувете је у слојевима од по 6 mL, додавана сахароза за ултрацентрифугирање (Sucrose (saccharose) for density gradient ultracentrifugation, Merck) у концентрацијама од 37, 31, 25, 18 и 10% у PBS. Након наношења слојева сахарозе, епрувете су остављене 16 h на 4 °C, што је било неопходно да би градијент сахарозе дифузијом из дисконтинуираног прешао у континуирани. Непосредно пре ултрацентрифугирања, по 0,5 mL узорка нането је на врх градијента сахарозе. Узорци су центрифугирани на 10 °C на 200.000 x g (44.100 rpm) 4 h и 45min. Након тога, фракције од по 0,5 mL су сакупљане од врха ка дну градијента. За сваку фракцију измерена је апсорбанца на 280 nm ( $A_{280}$ ) коришћењем спектрофотометра (Ultrospec 3300 pro (Amersham Bioscience, Upsala, Шведска)).

#### 4.2.14. Скенирајућа електронска микроскопија

Скенирајућом електронском микроскопијом анализирани су величина и структура агрегираног и нативног албумина, нативних IgG и агрегираних IgG, као и појединачних СИС здравих особа и особа са РА. Узорак за анализу је припреман тако што је по 10  $\mu$ L неразблажених узорака нането на поликарбонатне мембранске филтере пречника 13 mm, са величином пора од 0,1  $\mu$ m (SPI Supplies) и фиксирано 30 min у 2,5% раствору глутаралдехида у PBS. Након фиксирања на мембране је додато по 30  $\mu$ L 1% раствора осмијум-тетроксида у PBS. Након 30 min инкубације, мембране су испране два пута са по 80  $\mu$ L PBS, а затим су узорци дехидрирани превођењем кроз серију раствора етанола (10, 30, 50, 70, 95 и 100%) у трајању од 5 min за сваку концентрацију, а потом подвргнути критичној тачки сушења, коришћењем течног угљен-диоксида (Bal-Tech critical point dryer, Чешка). Након облагања златом (на уређају Polaron SC502 Sputter Coater), визуелизација је извршена скенирајућим електронским микроскопом са емисијом поља (FE-SEM TESCAN MIRA 3 XMU, Tescan, Чешка) на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, при напону од 10 kV.

#### 4.2.15. Микроскопија атомских сила

Величина и структура нативног и агрегираног албумина, *in vitro* аналога имунокомплекса, (агрегираних IgG), као и појединачних СИС здравих особа и особа са РА одређивана је и микроскопијом атомских сила. Узорци су припремљени тако што је на плочице од лискуна додато по 10  $\mu\text{L}$  неразблаженог узорка који је затим фиксиран 30 min у 2,5% раствору глутаралдехида у PBS, а затим 30 min у 1% раствору осмијум-тетроксида у PBS. Узорци су након инкубације испрани у PBS два пута и дехидрирани растворима етанола растуће концентрације од 10, 30, 50, 70, 95 и 100% у трајању од 5 min за сваку концентрацију и чувани у апсолутном етанолу до AFM мерења (максимално 24h). AFM мерења су урађена на собној температури применом NTEGRA Prima система произвођача NT-MDT (NTMDT Co, Русија) на Институту за физику, Универзитета у Београду. Снимање узорака је обављено у *tapping* режиму коришћењем NSG01 сонде, вибирањем носача сонде (побуђене око своје механичке резонанце) изнад површине узорка, при чему врх додирује површину једном у сваком циклусу осцилације. За обраду AFM слика и за прорачуне дистрибуције величина честица коришћен је *Gwydion* програм.

#### 4.2.16. Математичка обрада резултата

Пикови расподеле величина честица добијених фотон корелационом спектроскопијом детектовани су помоћу *Excel* програмског пакета и R програмског језика. Добијени подаци су затим груписани како би се направио систем референтних вредности за дистрибуцију величине (хидродинамичког пречника) колоидних честица у СИС изолованих из серума здравих особа и на основу тога дефинисала дистрибуција величине (хидродинамичког пречника) колоидних честица у СИС.

#### 4.2.17. Статистичка анализа

Израчунавање дескриптивне статистике извршено је за сваки анализирани параметар посебно, коришћењем софтвера *SPSS v.25*. Нормалност дистрибуције одређена је Shapiro Wilk тестом. Повезаност између два параметра одређена је, у зависности од нормалности њихових дистрибуција, Пирсоновом корелацијом (*Pearson product-moment correlation*) или Спирмановим тестом (*Spearman rank-order correlation test*). Статистички значајна разлика између анализираних група је, на основу нормалности дистрибуције, процењена помоћу *two-tailed t*-теста или *Mann-Whitney U* тестом. Разлике са *p*-вредностима  $< 0,05$  сматране су значајним.

PCS подаци су анализирани *Mann-Whitney U* тестом са циљем да се процени разлика између РА и контролне групе у укупном броју честица одређене величине (на основу 10 поновљених мерења за сваки узорак). *Fisher's exact* тест је коришћен да би се утврдила разлика између РА и контролне групе у броју СИС узорака који су садржали честице одређене величине (независно од броја понављања) при чему су *p*-вредности  $< 0,10$  сматране значајним.

## 5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### 5.1. Анализа величине и структуре *in vitro* формираних агрегата албумина и имуноглобулина и *in vitro* формираних имунокомплекса

У оквиру ове докторске дисертације пошло се од претпоставке да је применом фотон корелационом спектроскопијом, методом која се данас користи у фармацеутској индустрији за детекцију присуства агрегата у протеинским терапеутицима, а самим тим и у препаратима терапеутских (моноклонских и поликлонских) имуноглобулина, могуће проценити величину колоидних честица у имунокомплексима, који представљају агрегате молекула антитела умрежених антигеном, формираним у физиолошким и патолошким стањима људи.

Да би се ова претпоставка потврдила, и да би се показало да је могуће ову методу применити за анализу *in vivo* формираних имунокомплекса, у првој фази овог истраживања је фотон корелационом спектроскопијом анализирана:

- 1) Величина и структура нативног и топлотом агрегираног албумина - модела идеално глобуларног протеина;
- 2) Величина нативних и топлотом агрегираних IgG молекула, који представљају *in vitro* аналоге имунокомплекса, са циљем испитивања могућности анализе IgG, али и осталих класа имуноглобулина, чија структура одступа од идеално глобуларне;
- 3) Величина *in vitro* формираних комплекса антитела (антитело на к лаке ланце имуноглобулина) и антигена (IgG из периферне крви човека) при различитом односу антигена и антитела – што је од значаја за потврду примене ове методе за праћење промене структуре имунокомплекса.

Резултати анализе расподеле величине честице које улазе у састав СИС телади фотон корелационом спектроскопијом добијени у оквиру студије спроведене у Групи за имунологију Института за медицинска истраживања показали су да су ови узорци полидисперзни (индекс полидисперзности у опсегу 0,422-1,000) (*непубликовани резултати Групе за имунологију Института за медицинска истраживања*), па се сличан резултат могао очекивати и за расподелу величина честица које улазе у састав СИС човека. За полидисперзне и хетерогене узорке би најбоље било применити *contin* алгоритам за анализу података добијених на основу динамичког расејавања светлости [84]. Међутим, имајући у виду да овај алгоритам анализе не улази у састав софтверског пакета апарата који су широко доступни, а који се користе и за потребе истраживања и за потребе фармацеутске и биотехнолошке индустрије, у овом истраживању коришћена је *CUMULANT* метода, која улазе у састав ових софтверских пакета, иако смо били свесни да се овај метод анализе пре свега препоручује за монодисперзне системе.

У оквиру ове докторске дисертације величина честица у препаратима нативних и *in vitro* агрегираних молекула албумина и имуноглобулина, додатно је анализирана неком од метода анализе протеинских агрегата (укључујући и имунокомплексе), које се због своје комплексности и трајања извођења користе у истраживачке, али не и у дијагностичке сврхе. Конкретно, уз анализу фотон корелационе спектроскопије, коришћене су методе је и ултрацентрифугирања, гел филтрације, као и микроскопске методе (SEM и AFM).



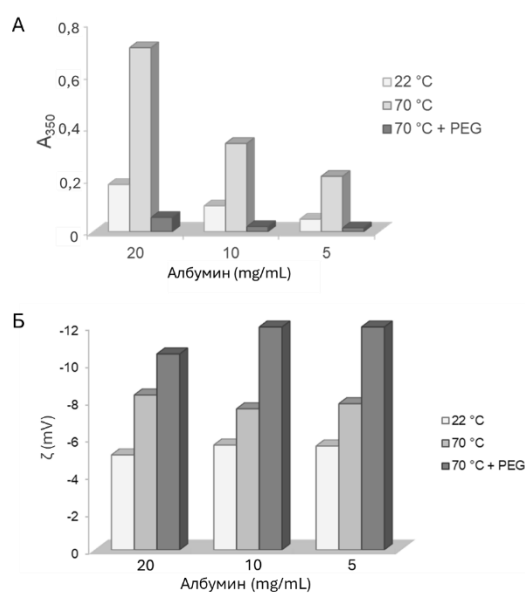
### 5.1.1. Анализа величине и структуре *in vitro* формираних агрегата албумина

#### 5.1.1.1. Агрегација албумина топлотом

Да би се добио препарат агрегираног албумина, нативни хумани албумин у концентрацији од 20, 10 и 5 mg/mL је загреван 10 min на 70 °C. У овој студији коришћен је високо пречишћен препарат за интравенску употребу, јер је познато да физиолошки протеински контаминанти (нпр. хаптоглобин) могу да мењају агрегабилност албумина [122] и утичу на добијене резултате. Такође, коришћене су три концентрације албумина имајући у виду да концентрација протеина утиче на њихову агрегабилност [137,138]. Познато је да протеини у својој нативној конформацији растворени у води или физиолошким пуферима не апсорбују светлост на таласним дужинама већим од 320 nm. С друге стране,  $A_{350}$  је апсорбанца светлости која је директно пропорционална количини протеинских агрегата [139]. Због ове особине, мерење  $A_{350}$  PEG преципитираних протеина серума представља рутински, клинички скрининг метод за процену нивоа СИС [140].

Непосредно пре анализе фотон корелационом спектроскопијом, мерењем  $A_{350}$  показано је да загревање на 70 °C доводи до агрегирања овог молекула, и повећања вредности  $A_{350}$  (слика 5.1.A), при чему је вредност  $A_{350}$  била пропорционална концентрацији албумина ( $r = 0,996$ ). Након додавања 3% PEG у раствор агрегираног албумина, вредност  $A_{350}$  је пала на вредност нижу од оне која је детектована у препарату нативног албумина, а овакав резултат је последица селективне преципитације протеинских агрегата одређене величине у присуству PEG [141-143].

Непосредно пре анализе фотон корелационом спектроскопијом измерен је  $\zeta$  потенцијал у препаратима неагрегираног и агрегираног албумина и показано је да агрегирање за последицу има пораст  $\zeta$  потенцијала (слика 5.1.B). У фракцији агрегата албумина које је било могуће преципитирати применом 3% раствора PEG,  $\zeta$  потенцијал је био два пута већи него у препарату нативног албумина. Иако су измерене вредности  $\zeta$  потенцијала агрегираног албумина биле мање од  $\pm 30$  mV, (што је вредност која указује на стабилност једног колоидног система [144]) повећање вредности након загревања говори у прилог повећању колоидне стабилности агрегираног албумина [145,146].



Слика 5.1.  $A_{350}$  (A) и  $\zeta$  потенцијал (B) нативног и агрегираног албумина

### 5.1.1.2. Анализа величине нативног албумина и албумина агрегираног топлотом фотон корелационом спектроскопијом

Фотон корелационом спектроскопијом одређена је расподела величина честица у препаратима нативног албумина концентрације 20, 10 и 5 mg/mL и агрегираног албумина. Дистрибуција величине колоидних честица је приказана као дијаграм зависности релативног интензитета расуте светлости од пречника колоидних честица (слика 5.2). У препаратима нативног албумина у концентрацијама од 20 и 5 mg/mL преобладавале су честице величине 8,7 nm, али су биле присутне и честице величине 7,5 nm (детектоване три пута у препарату концентрације 20 mg/mL и једном у препарату концентрације 5 mg/mL). Број честица детектованих у препарату нативног албумина концентрације 10 mg/mL је био већи. Најчесталије честице су пречника 10,1 nm (регистроване у седам од 10 снимака) и честице пречника 11,7 nm (регистроване у три од 10 снимака), али су детектовани и сигнали слабог интензитета који су потицали од честица пречника 78,8, 104, 190, 220, 255, 342, 712, али и честица већих од 1000 nm.

И у препаратима албумина агрегираног топлотом, дистрибуција величине честица је зависила од његове концентрације. Широка дистрибуција величина честица је детектована једино у препарату агрегираног албумина концентрације 20 mg/mL. У овом препарату најинтензивнији сигнал је потицао од честица пречника: 58,8 nm (један од 10 снимака), 68,0 nm (четири од 10 снимака), 91,2 nm (један од 10 снимака), 122 nm (два од 10 снимака), 142 nm (један од 10 снимака) и 164 nm (један од 10 снимака). Нешто нижи сигнал је потицао од честица пречника 24,4, 37,9, 58,5, 220, 342, 396, 615 и 1281 nm. У овом препарату детектоване су у свих 10 снимака честице веће од 2500 nm, али је интензитет сигнала који потиче од ових честица био низак.

У препарату агрегираног албумина концентрације 10 mg/mL као доминантне, тј. честице од којих потиче највећи интензитет расуте светлости, се детектују честице величине 58,8 nm (пет од 10 снимака) и 68,0 nm (пет од 10 снимака). Само једном је детектована честица од 10,1 nm, а у пет од 10 снимака су детектоване честице веће од 2500 nm. У препарату агрегираног албумина концентрације 5 mg/mL у четири снимка се као доминантне детектују честице полупречника од 50,8 nm и шест пута су детектоване честице величине 58,8 nm. Детектовано је присуство и честица величине 11,7 и 13,5 nm (у по једном од 10 снимака), док је присуство честица већих од 2500 nm није детектовано у само једном од 10 снимака. Интензитет сигнала који је потицао од ових честица је био низак.

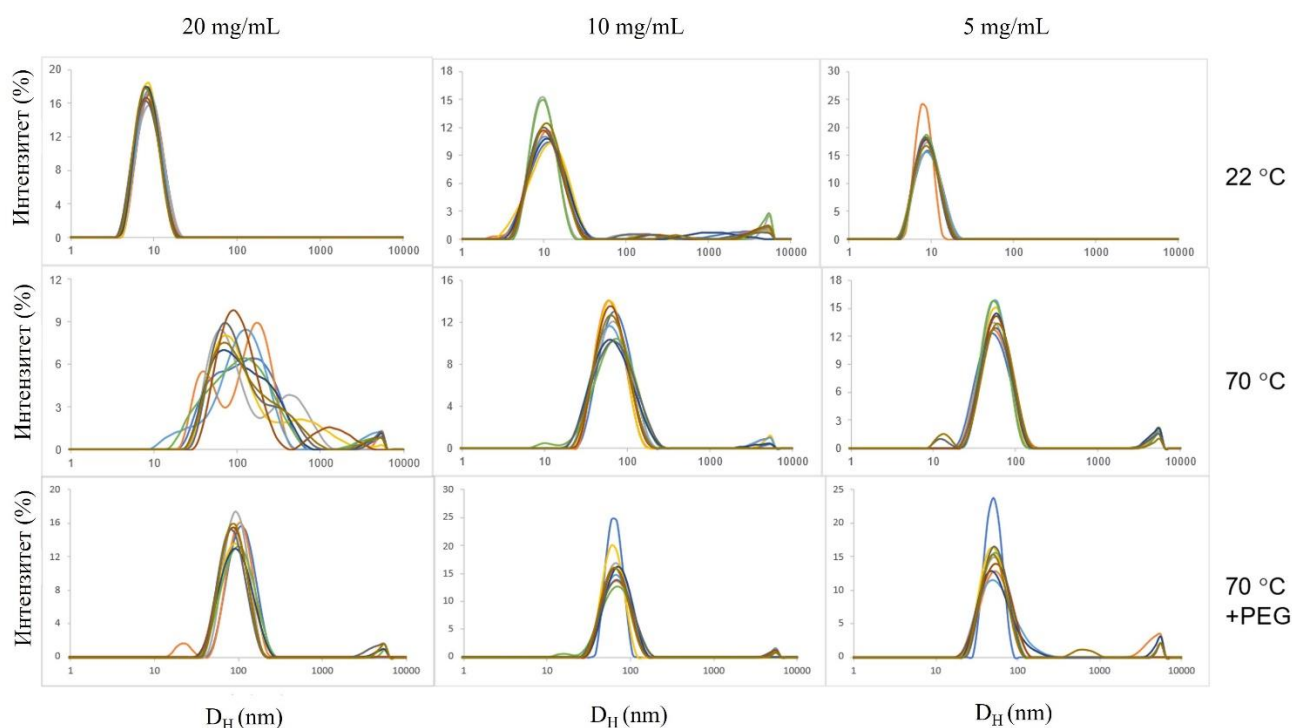
Да PEG селективно преципитира само агрегате одређене величине видело се на основу резултата анализе препарата са највећом концентрацијом албумина коришћеној у овој студији (20 mg/mL). За разлику од честица укупних агрегата албумина концентрације 20 mg/mL, честице PEG преципитабилне фракције ових агрегата са много ужом дистрибуцијом величина. Као доминантне су детектоване честице полупречника 78,8 nm (један од 10 снимака), 91,2 nm (пет од 10 снимака) и 106 nm (четири од 10 снимака). У овом препарату, једанпут је детектована честица од 21,0 nm, а честице веће од 2500 nm су детектоване шест пута. У PEG преципитабилној фракцији агрегата албумина концентрације 10 mg/mL као доминантне се издвајају честице 58,5 (два од 10 снимака) и 68,0 nm (осам од 10 снимака). Низак интензитет сигнала је потицао од честица величине 15,7 nm (у само једном од 10 снимака) и честица већих од 2500 nm (пет од 10 снимака). У PEG преципитабилној фракцији агрегата албумина концентрације 5 mg/mL у свих 10 снимака се као доминантна детектује честица пречника 50,8 nm. Низак интензитет сигнала је потицао од честица од 615 nm (само један снимак) и честица већих од 2500 nm (пет од 10 снимака).

Иако је утицај састава пуфера, рН вредности и јонске јачине на агрегабилност протеина добро познат [138,147,148], разлике у степену агрегабилности показане у нашој студији се не би могле повезати ни са једним од ових фактора, јер је албумин (иницијалне

концентрације 22% w/v) разблаживан до потребних концентрација искључиво у PBS, при чему су све припреме и мерења урађени са истом комерцијалном серијом PBS и истог дана, тако да је ефекат промене састава пуферског раствора на добијене резултате искључен. С обзиром на чињеницу да су сви експерименти урађени са једном серијом албумина ефекат различитог степена гликације на агрегабилност албумина [149], иако могућ, је мало вероватан.

Поред познатог ефекта концентрације протеина на његову агрегабилност [140,141] и постојања денатурираних форми молекула албумина са различитим степеном агрегабилности [150] не треба занемарити ни утицај присуства у траговима физиолошких, али термички нестабилних протеина (нпр. хаптоглобин) који „заробљавају“ мало албумина и формирају „острва“ у којима, иначе термално стабилан албумин, чине подложним агрегацији [151].

Који од наведених разлога су од значаја за показане разлике у величини доминантних колоидних честица у препаратима албумина (а које смо детектовали фотон корелационом спектроскопијом) у овом моменту није јасно и није предмет истраживања ове докторске дисертације. Међутим, добијени резултати су показали да се овом методом, могу детектовати и мале разлике у величини колоидних честица присутних у растворима албумина.

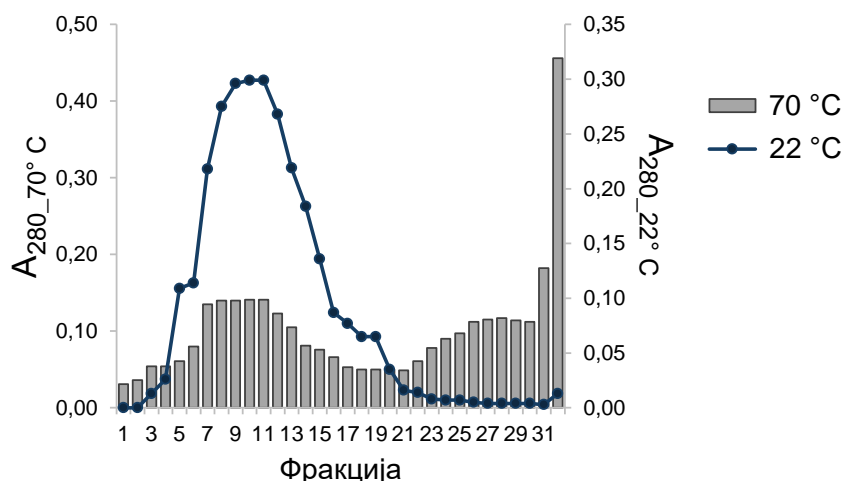


**Слика 5.2.** Анализа величине колоидних честица у препаратима нативног и топлотом агрегираног албумина фотон корелационом спектроскопијом  
 Резултати су приказани као зависност процента интензитета расуте светлости од пречника честица.  $D_H$  (nm): хидродинамички пречник колоидних честица.

### 5.1.1.3. Анализа величине нативног албумина и албумина агрегираног топлотом ултрацентрифугирањем

Ултрацентрифугирање на градијентима сахарозе је широко коришћен метод за раздвајање макромолекула на основу коефицијента седиментације, тј. величине [72]. У овом раду су величина нативног и топлотом агрегираног албумина, концентрације 5 mg/mL, поређене на основу резултата раздвајања ултрацентрифугирањем у континуираном сахарозном градијенту концентрације 10-37%. По завршеном центрифугирању, сакупљане су фракције у запремини од 0,5 mL и у свакој фракцији је садржај протеина процењен на основу  $A_{280}$  (слика 5.3). Иако је познато да протеини интензивно апсорбују светлост у UV области и да се на основу  $A_{280}$  може одредити концентрација протеина у препаратима нативног албумина (хумани албумин: моларни екстинкциони коефицијент хуманог албумина на 280 nm:  $35,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $66439 \text{ g/mol}$ ;  $A_{280(1\text{mg/mL})} = 0,537$ ), у овој студији то није рађено. Наиме, на 280 nm максимуме апсорбанције имају аминокиселине тирозин, триптофан, цистеин и фенилаланин, које након денатурације протеина бивају изложене на површину протеина, па се  $A_{280}$  денатурисаних, тј. агрегираних протеина повећава [152]. Самим тим и одређивање концентрације агрегираног албумина, и поређење са концентрацијом нативног албумина на основу вредности  $A_{280}$  није поуздано.

Након раздвајања нативног албумина ултрацентрифугирањем, највеће вредности  $A_{280}$ , тј. највећа количина протеина је детектована у фракцијама 8-12 ( $A_{280}$ : 0,268 - 0,299), али је дистрибуција расподеле била шира и  $A_{280}$  већа од 0,010 у фракцијама од 3 до фракције 22. За разлику од резултата фотон корелационе спектроскопије, албумин у препарату агрегираног албумина има широку дистрибуцију. На графику који приказује  $A_{280}$  у фракцијама агрегираног албумина (слика 5.3) уочавају се два широка врха: први који приближно одговара пику неагрегираног албумина (фракције 7-12) и други који формирају фракције 23-30. Ипак, највеће вредности  $A_{280}$  су детектоване у фракцијама 31 и 32, тј. у талогу, где су се акумулирали агрегати највеће молекулске масе.



Слика 5.3. Анализа нативног и агрегираног албумина ултрацентрифугирањем

Резултати анализе нативног и агрегираног албумина добијени фотон корелационом спектроскопијом и ултрацентрифугирањем није било могуће директно упоредити. Релативно висок садржај „нативног“ албумина у препарату агрегираног албумина може се објаснити тиме што агрегирање хуманог албумина топлотом, слично агрегирању говеђег албумина (хомологија у аминокиселинској секвенци од 75,52%), представља вишестепени процес. Vorzova и сар. (2017) су показали да загревање говеђег албумина раствореног у PBS раствору у концентрацији 1 mg/mL доводи до формирања

две, не-нативне форме које имају различиту „агрегабилност“ [153]. Молекулска форма са високим степеном агрегабилности је одговорна за формирање тзв. примарних агрегата са хидродинамичким пречником од 10,3 nm. Молекулска форма са ниским степеном агрегабилности се или „самоагрегира“ формирајући стабилне агрегате малих димензија или се везује за примарне агрегате и формира секундарне агрегате, честице величине 15,1 nm (при загревању на 70 °C). Даља агрегација и формирање великих полидисперзних агрегата представља резултат „слепљивања“ секундарних агрегата.

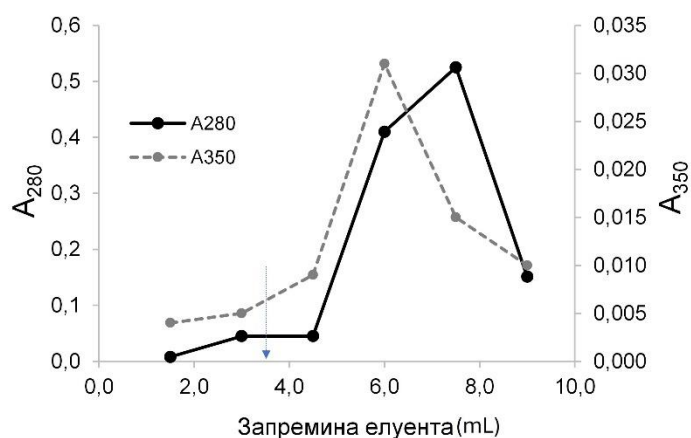
Иако испитивање фаза у агрегирању хуманог албумина топлотом није предмет испитивања ове докторске дисертације, чињеница да је при загревању говеђег албумина на 70 °C формирање примарних и секундарних агрегата сразмерно, и да након 10 min загревања остаје нешто мање од 20% молекула у нативној форми [156], може да објасни широку дистрибуцију расподеле агрегираног хуманог албумина у сахарозном градијенту. Такође, не може се искључити могућност распадања реверзибилно формираних агрегата под утицајем снажне центрифугалне силе, што за последицу може да има ширу расподелу величина добијену ултрацентрифугирањем у односу на ону добијену фотон корелационом спектроскопијом.

#### 5.1.1.4. Гел филтрација албумина агрегираног топлотом

Гел филтрација је често коришћена метода за раздвајање макромолекула по величини (тј. молекулској маси) [72]. У оквиру ове докторске дисертације испитано је да ли се овом методом може утврдити да постоје фракције различитих величина у препарату агрегираног албумина концентрације 5 mg/mL.

Фракционисање гел филтрацијом на Sephacryl S-300 матриксу (опсег раздвајања: 10-1500 kD за глобуларне протеине) у којој се пуфер кретао гравитационим током је праћено на основу  $A_{280}$  и  $A_{350}$  у фракцијама елуента. Препарат агрегираног албумина је елуиран у форми једног широког пика, тј. нисмо успели да покажемо присуство фракција различите молекулске масе у овом препарату. Међутим, пик на  $A_{350}$  је претходио пику на  $A_{280}$ , што може да укаже на то да су се (у већем степену) агрегирани молекули албумина, који апсорбују на 350 nm, као „тежи“ елуирали пре главнине фракције (у мањем степену агрегирани или неагрегирани молекули албумина) (слика 5.4).

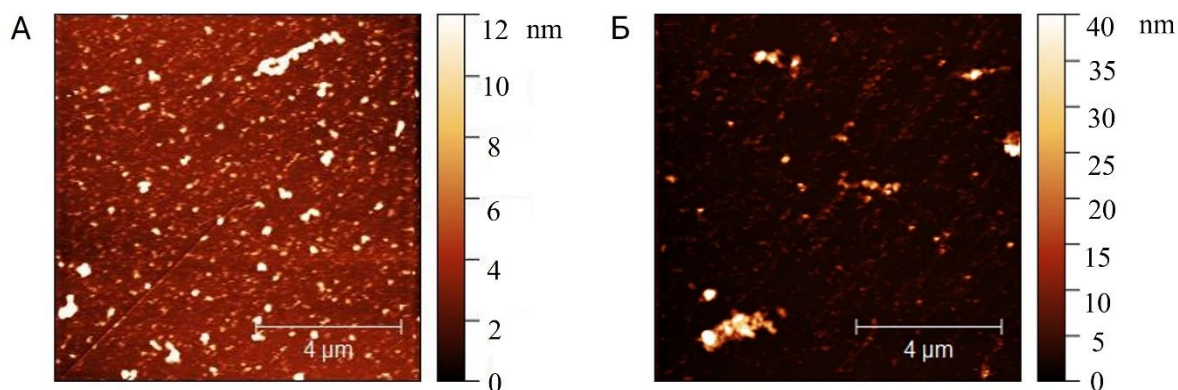
Резултати анализе агрегираног албумина гел филтрацијом нису могли бити директно упоређени са резултатима ултрацентрифугирања и резултатима фотон корелационе спектроскопије (слика 5.2). Међутим, не може се искључити могућност да би се применом HPLC гел филтрације можда добили резултати који су у већој мери усаглашени са наведеним методама.



**Слика 5.4.** Гел филтрација агрегираног албумина на Sephacryl S-300 матриксу  
Плава стрелица – почетак елуирање плавог декстрана молекулске масе 1000 kDa

### 5.1.1.5. AFM анализа величине и структуре нативног албумина и албумина агрегираног топлотом

AFM анализом добијене су информације о расподели величина честица као и о њиховој морфологији у препаратима нативног албумина (слика 5.5.А) и албумина агрегираног топлотом (слика 5.5.Б). Честице у препарату нативног албумина су веома сличне морфологије и униформне расподеле величина са просечном величином  $15,09 \pm 5,92$  nm. Агрегација топлотом доводи до пораста величине и промене морфологије честица у анализираним препаратима, при чему је одређена просечна величина честица износила  $42,47 \pm 17,45$  nm.



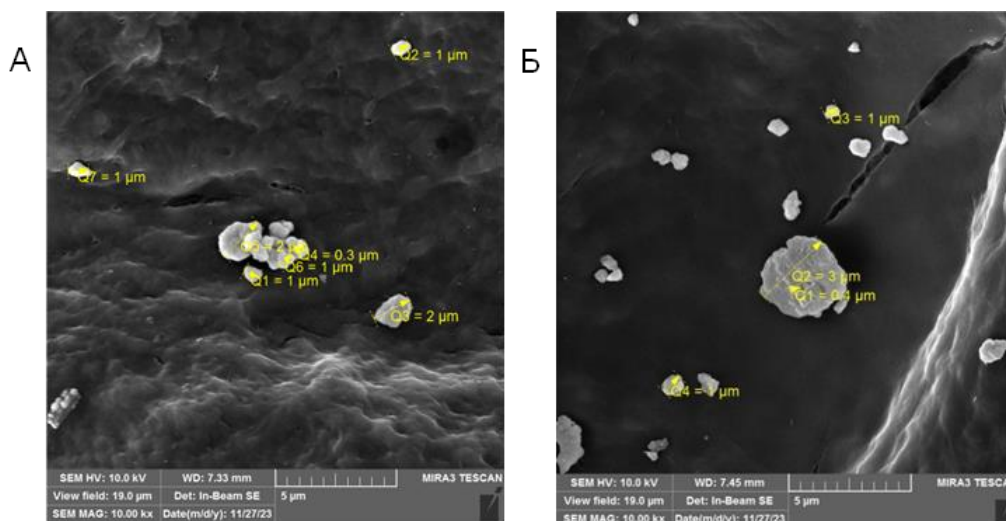
Слика 5.5. AFM анализа нативног (А) и агрегираног (Б) албумина

### 5.1.1.6. SEM анализа величине и структуре нативног албумина и албумина агрегираног топлотом

SEM анализом добијен је јаснији приказ морфологије и величине честица у препарату нативног албумина (слика 5.6.А) и агрегираног албумина (слика 5.6.Б). Средња вредност величина честица у препарату нативног албумина је била 1-2 μm. И овом методом, како и свим претходно приказаним, показано је да се агрегирањем топлотом формирају веће честице (3-4 μm), али и да постоји одређен број мањих честица које потичу од неагрегираних или делимично агрегираних молекула албумина. Ови резултати донекле у корелацији са широком дистрибуцијом расподеле величине честица у препарату агрегираног албумина која је детектована ултрацентрифугирањем на градијенту сахарозе. Мање честице у овим препаратима су уочене и фотон корелационом спектроскопијом.

Међутим, мора се нагласити да сам поступак фиксације и остали кораци у припреми узорка за микроскопске анализе денатуришу протеине и доводе до њиховог агрегирања, и у препарату нативног албумина и у препарату агрегираног албумина. Сматрамо да су због тога, величине честица детектоване микроскопским методама (AFM и SEM) вишеструко веће од оних детектованих фотон корелационом спектроскопијом и оних које би се реално могле очекивати у физиолошким условима. Однос просечне величине агрегираних/нативних молекула албумина се поклапа са оним мереним AFM микроскопијом (2:1), иако се измерене величине не подударују, што може бити последица другачије припреме узорка које захтевају ове методе.





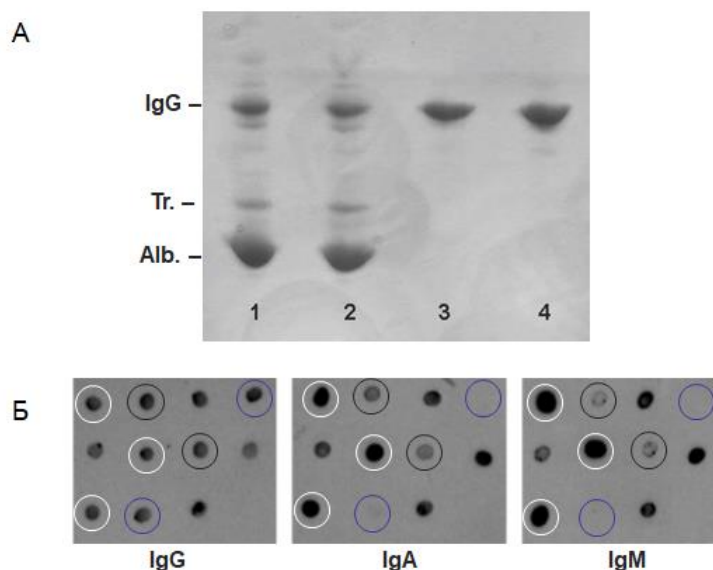
Слика 5.6. SEM анализа нативног (А) и агрегираног (Б) албумина

## 5.1.2. Анализа величине и структуре нативних и IgG агрегираних топлотом - *in vitro* аналога имунокомплекса

### 5.1.2.1. Изоловање и карактеризација хуманих IgG

За потребе овог рада IgG је изолован из збирног узорка серума 300 добровољних давалаца крви афинитетним хроматографијама на протеину Ге и протеину А. Иако се често ова два протеина користе за изоловање укупних IgG молекула из неке телесне течности или ћелијске културе, њихова способност везивања различитих молекулских форми није иста, и због тога је одлучено да се у овом раду примене оба матрикса. Наиме, протеин Ге (протеин Ге групе ( $\beta$  хемолитичких) бактерија рода *Streptococcus*) високим афинитетом везује све подкласе IgG молекула преко њихових Fc региона и не везује друге класе имуноглобулина [154]. Опште прихваћено је да протеин А (протеин *Staphylococcus aureus*) везује хумане IgG1, IgG2 и IgG4 преко Fc фрагмената, али да не интерагује са IgG3 [155]. Међутим, протеин А интерагује са неким алотипским (или другим молекулским) варијантама IgG3 [156,157], а за разлику од протеина Ге, везује и неке молекулске форме хуманих IgM и IgA, али и IgG преко F(ab')<sub>2</sub> фрагмената [158,159], као и IgE [160,161]. Природни протеин А, везује и албумин, преко региона који је удаљен од региона којим везује имуноглобулине, и овај регион је уклоњен из рекомбинантних форми протеина А, који се данас користе за хроматографске матриксе, и који су коришћени у овој студији.

Након афинитетне хроматографије на протеину Ге и протеину А, чистоћа изолованих IgG је анализирана SDS-PAGE у нередукуюћим условима (слика 5.7А). Овом методом је у оба изолата показано присуство протеина који по електрофоретској покретљивости одговарају молекулу IgG, док албумин и трансферин, као ни други серумски протеини нису детектовани. IgG, IgM и IgA у изолатима су анализирани дот блотом (слика 5.7Б). Ова анализа је показала да су се афинитетном хроматографијом на протеину Ге изоловали искључиво IgG имуноглобулини, док су у изолатима на протеину А налазили и имуноглобулини IgM и IgA.



**Слика 5.7.** Анализа протеина збирног хуманог серума афинитетно изолованих на протеин Ге и протеин А сефарози

(А) SDS-PAGE у нередукјућим условима. 1 - протеини који се нису везали за протеин Ге, 2 - протеин који се нису везали за протеин А, 3 - протеини који су се везивали за протеин Ге, 4 - протеини који су се везивали за протеин А; Alb. – албумин, Tr – трансферин.

(Б) Дот блот детекција присуства IgG, IgA и IgM у изолатима на протеинима Ге и А. Узорци означени белим кружницама: контрола, нефракционисан збирни узорак серума; Узорци означени црним кружницама: изолати на протеину А; Узорци означени љубичастим кружницама: изолати на протеину Ге. Неозначени узорци: узорци који нису анализирани у овој студији.

Концентрације укупних IgG, IgG подкласа, IgA и IgM у изолатима на протеинима А и Ге је одређена имунонефелометријском методом (табела 5.1). У оба изолата били су најдоминантнији IgG1 молекули који су и највише заступљена подкласа IgG у серуму човека. У добијеним изолатима се налазило више од 60% IgG1, што и одговара уделу IgG1 у укупним IgG серума [28,31]. У складу са наведеним карактеристикама матрикса, садржај IgG3 је био нижи у изолатима добијеним на протеину А у односу на изолате добијене на протеину Ге. У овом раду нису испитиване молекулске варијанте IgG3 које су се везивале за протеин А, али би оне могле бити предмет истраживања у будућности уз развијање оптималног протокола за изоловање специфичних молекулских форми IgG. Такође, битно је напоменути да је ниво концентрације IgA и IgM, како у изолатима на протеину Ге тако и у изолатима протеину А, био испод нивоа детекције имунонефелометријом (табела 5.1). У овом моменту се не може закључити да ли IgA и IgM, (који су били присутни у траговима у изолатима на протеину А и били детектабилни само дот блотом) представљају молекуле који су се преко својих F(ab')<sub>2</sub> фрагмената везали за протеин А или су део имунокомплекса који нормално постоје у циркулацији копреципитирали са IgG, или представљају неспецифично адсорбоване протеине. Међутим, овакав резултат је потврдио већу осетљивости дот блот анализе у односу на имунонефелометрију, што чини дот блот методу избора за детекцију протеина присутних у траговима у неком протеинском препарату/изолату. Такође, овакав резултат је потврдио боље перформансе за изоловање укупних IgG у матриксу са протеином Ге у односу на матриксу са протеином А.

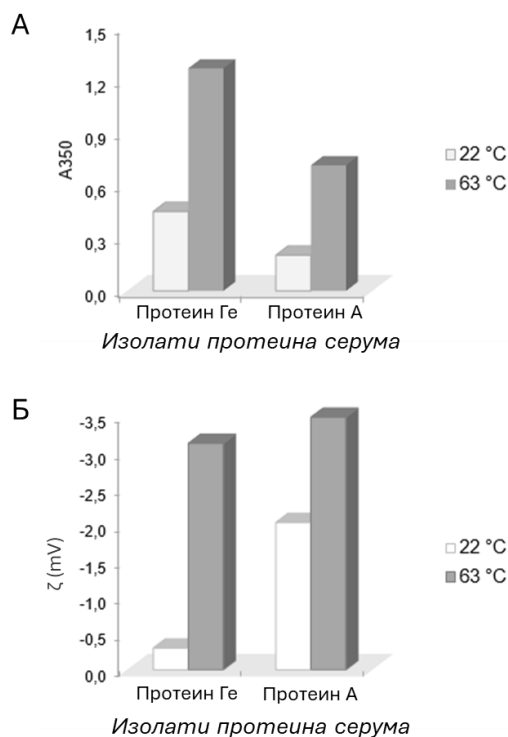


**Табела 5.1.** Концентрација укупних IgG, IgA и IgM и IgG подкласа у фракцији протеина збирног узорка серума афинитетно изолованих на протеин Ге или протеин А сефарози

	Изолати	
	протеин Ге	протеин А
IgG (mg/mL)	2.230	1.230
IgM (mg/mL)	<0.175 <sup>a</sup>	<0.175 <sup>a</sup>
IgA (mg/mL)	<0.259 <sup>a</sup>	<0.259 <sup>a</sup>
IgG1 (mg/mL)	1,620	0,874
IgG2 (mg/mL)	0,741	0,433
IgG3 (mg/mL)	0,048	0,009
IgG4 (mg/mL)	0,085	0,061
IgG1 (%)	65,0	63,5
IgG2 (%)	29,7	31,4
IgG3 (%)	1,9	0,6
IgG4 (%)	3,4	4,5

<sup>a</sup> Концентрација IgA и IgM - испод границе осетљивости имунонефелометрије.

Иоловани IgG су агрегирани топлотом, 10 min на 63 °C. Након загревања у изолатима IgG на протеину Ге и протеину А детектован је пораст вредности  $A_{350}$  од 2,8 и 3,5 пута, чиме је потврђена успешност агрегације (слика 5.8А). Након агрегације топлотом, вредност  $\zeta$  потенцијала IgG изолованих на протеину Ге је била 10,4 пута већа у односу на неагрегиране молекуле. Пораст  $\zeta$  потенцијала агрегираних IgG изолованих на протеину А је био мањи (1,65 у односу на неагрегиране молекуле; слика 5.8Б), што може бити последица присуства мање агрегабилних форми IgG у овом изолату [162] или присуства већег броја различитих изотипова молекула имуноглобулина.

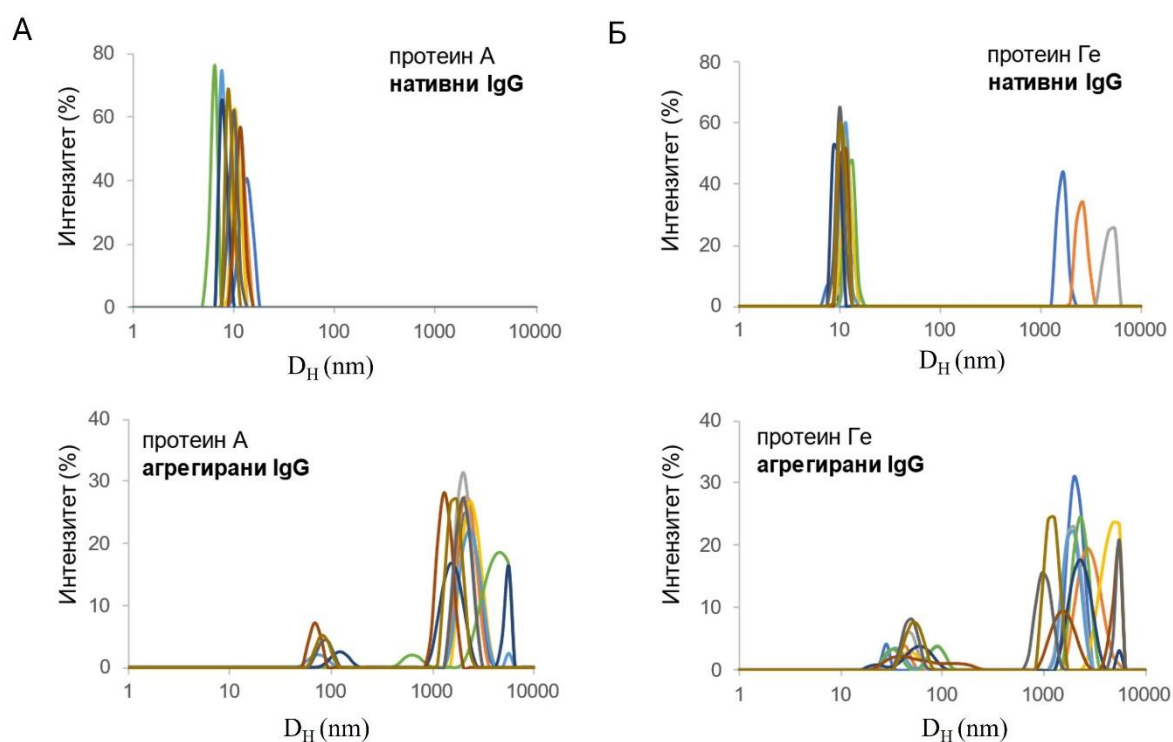


**Слика 5.8.**  $A_{350}$  (А) и  $\zeta$  потенцијал (Б) нативног и агрегираног IgG

### 5.1.2.2. Анализа величине нативног IgG и IgG агрегираног топлотом фотон корелационом спектроскопијом

Фотон корелационом спектроскопијом анализирана је расподела величина честица у препаратима нативног и агрегираног IgG изолованог афинитетном хроматографијом на колонама протеин А или протеин Ге сефарозе.

Резултати ове анализе приказани на слици 5.9 и табели 5.2 су показали да се у изолатима нативних IgG налазе честице величине од 6,53 до 13,5 nm, при чему су највећи број пута (три пута у изолатима на протеину А и четири пута у изолатима на протеину Ге) детектоване честице од 11,7 nm, што по подацима из литературе, приближно одговара величини нативних (мономерних) IgG молекули ( $11,5 \pm 0,5 \text{ nm}$ ; [163]). У изолатима на протеину Ге, али и на протеину А, су детектоване и честице веће од 1500 nm (по једна честица у три од 10 снимака). Дистрибуција величине на слици 5.9 је приказана као дијаграм зависности релативног интензитета расуте светлости од логаритма хидродинамичког пречника колоидних честица присутних у изолатима IgG. Однос процента интензитета расуте светлости и пречника честица је  $1:10^6$ , па је дистрибуција величине по интензитету расуте светлости веома осетљива на присуство великих честица или агрегата [164]. Поменута чињеница управо чини фотон корелациону спектроскопију методом избора за детекцију агрегата у препаратима протеинских терапеутика.



**Слика 5.9.** Анализа величине колоидних честица фотон корелационом спектроскопијом у препаратима нативног IgG изолованог на протеину А и агрегираног (А) и у препаратима нативног IgG изолованог на протеину Ге и агрегираног (Б) Резултати су приказани као зависност процента расуте светлости од пречника честица  $D_H$  (nm): хидродинамички пречник колоидних честица.

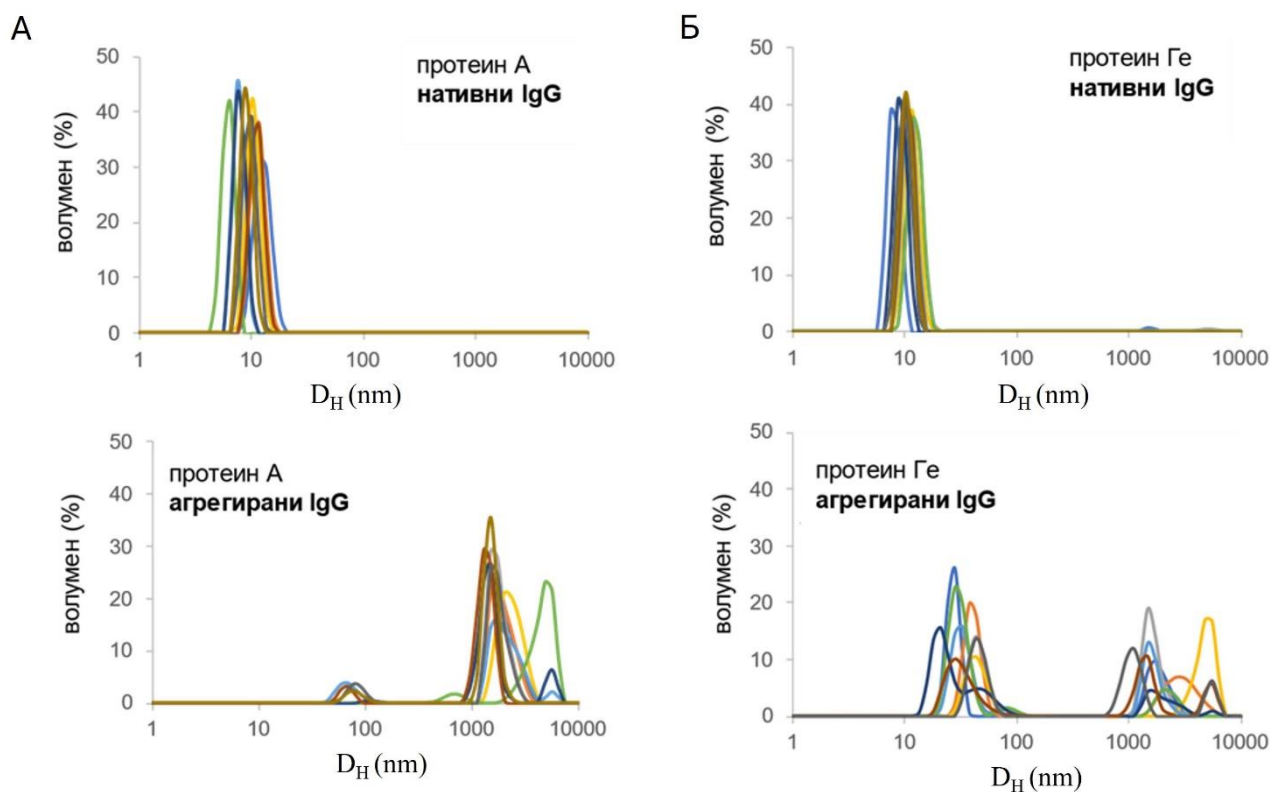
**Табела 5.2.** Фотон корелациона спектроскопија: Величина колоидних честица у препаратима нативног и агрегираног IgG

D (nm)	Протенин А		Протенин Г	
	Нативни	Агрегирани	Нативни	Агрегирани
	број поновака у 10 мерења			
6,53	1			
7,53	2			
8,72	1		2	
10,1	2		2	
11,7	3		4	
13,5	1		2	
24,4				1
28,2				1
32,7				1
37,8				1
43,8				2
50,8				4
68,1		1		1
78,8		1		
91,2		2		2
141,8		1		
164				1
712		1		
955				1
1281		1		1
1484		1		
1684		1		
1718			1	1
1990		2		3
2305		4		2
2669		1	1	1
5560		1	1	3
Типови честица	6	12	7	16

$D_H$  (nm)- хидродинамички пречник колоидних честица

Типови честица: Број честица различитог хидродинамичког пречника

На слици 5.10 приказани су подаци добијени фотон корелационом спектроскопијом представљени као зависност запреминског удела честица од њихове величине. Пикови који потичу од великих честица су били веома ниског интензитета (скоро на граници детекције). Запремински удео честица добија се из примарних података, на основу *Mie*-ове теорије [165]. Дистрибуција запреминског удела честица одговара дистрибуцији маса тј. тежини честица, веома је осетљива на присуство великих честица и користи се за процену релативног удела честица у одређеном пику у односу на укупне честице у анализираном узорку. Однос процента запремине расуте светлости и пречника честица је  $1:10^3$ , па је дистрибуција величине по волумену расуте светлости веома осетљива на присуство великих честица или агрегата [164]. Оваквом анализом показано је да су и у изолатима на протеину Ге мале честице (8,7 - 13,5 nm) биле главна компонента узорка, чинећи до 100% запремине узорка (слика 5.10).



**Слика 5.10.** Анализа величине колоидних честица фотон корелационом спектроскопијом у препаратима нативног IgG изолованог на протеину А и агрегираног (А) и у препаратима нативног IgG изолованог на протеину Ге и агрегираног (Б) Резултати су приказани као зависност запреминског удела честица од пречника.  $D_H$  (nm): хидродинамички пречник колоидних честица.

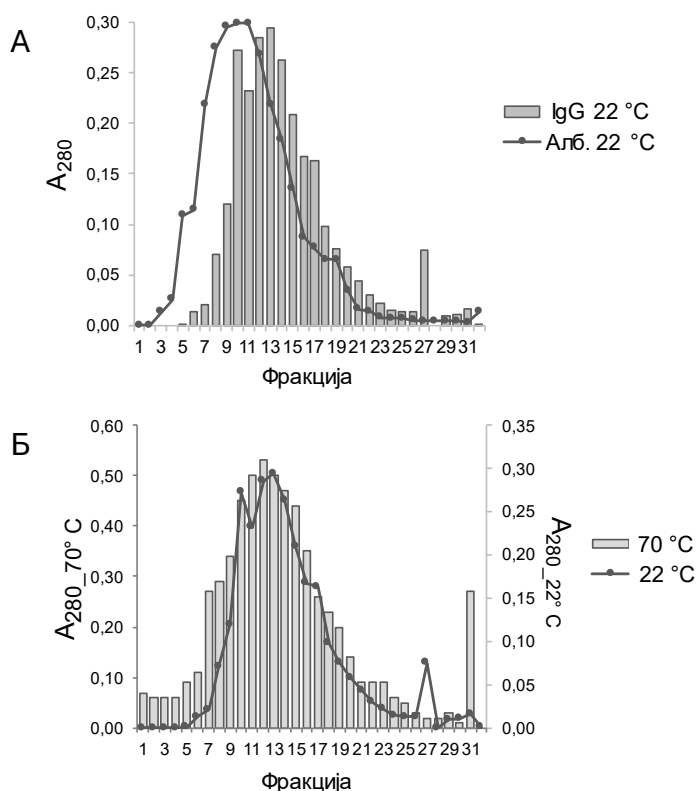
У препаратима агрегираних PEG преципитабилних IgG, фотон корелационом спектроскопијом је детектован померај ка већим честицама, при чему је и број типова честица (честице различите величине) био већи него у препаратима нативних IgG (слика 5.9). Без обзира на хроматографски матрикс коришћен за изолацију IgG, у препаратима агрегираних IgG нису детектоване честице које по величини одговарају нативним молекулима, али су детектоване честице мање од 100 nm и веће од 1000 nm. Када су подаци представљени као зависност запреминског удела честица од њихове величине показано је да главну компоненту оба *in vitro* формирана IgG агрегата чине честице веће од 1000 nm: 92,8% од запремина узорка за агрегирани изолат на протеину А и 68,4% запремине узорка за агрегирани изолат на протеину Ге (слика 5.10).

Мале разлике у величини честица које формирају главни пик у препаратима нативних IgG и пиковима у препаратима агрегираног IgG указује да је фотон корелациона спектроскопија детектовала и дискретне разлике у величини нативних IgG молекула (подкласе, а вероватно и неке постраничне модификације) и разлике у агрегабилности различитих молекулских форми IgG.

### 5.1.2.3. Анализа величине нативног IgG и IgG агрегираног топлотом ултрацентрифугирањем

Ултрацентрифугирање на градијентима сахарозе се деценијама користи као метод за изоловање и фракционисање природних и *in vitro* формираних имунокомплекса.

Како би се проценила аналитичка осетљивост ултрацентрифугирања на сахарозном градијенту концентрације 10-37%, прво су упоређени резултати раздвајања нативног IgG изолованог на протеину Ге и нативног албумина (слика 5.11А). Дистрибуција оба протеина након ултрацентрифугирања је била релативно широка. У складу са постојећим литературним подацима, резултати су показали да се албумин због своје мање молекулске масе (64 kDa) позиционира у зонама мање густине сахарозе (максимум  $A_{280}$  је детектован у фракцијама 8-12) у односу на IgG (максимум  $A_{280}$  је детектован у фракцијама 10-14) [166]. Ултрацентрифугирањем, слично као и фотон корелационом спектроскопијом, било је могуће показати присуство мале количине агрегата у препарату нативног IgG изолованог на протеину Ге (фракција 27).



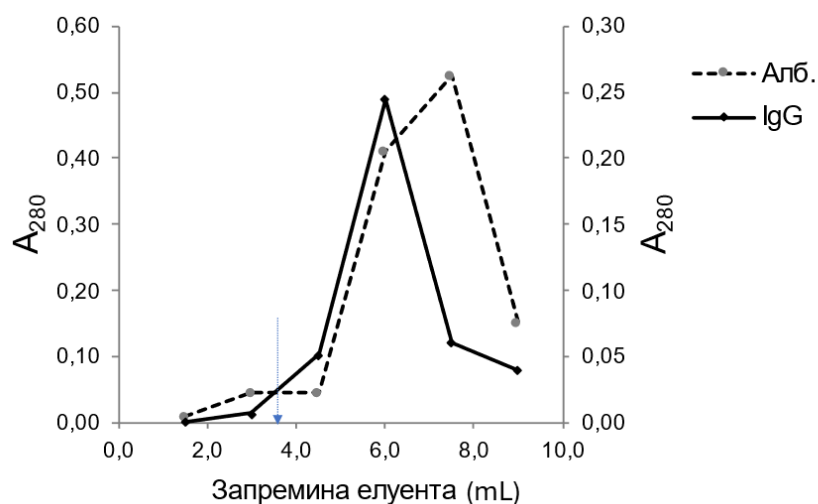
**Слика 5.11.** Анализа величине ултрацентрифугирањем нативног IgG изолованог на протеину Ге и нативног албумина (А) и нативног IgG и IgG агрегираног топлотом (Б)

Када је, након агрегирања топлотом нативних IgG, анализирана дистрибуција протеина у сахарозном градијенту, није запажен померај ка већим густинама сахарозе (тј. већим масама) агрегираних у односу на неагрегиране IgG (слика 5.11Б). Овакав резултат је био очекиван, јер се загревањем на 63 °C формирају нестабилни (иревверзибилни) агрегати IgG за које је познато да се разграђују на мономере под утицајем снажне центрифугалне силе [167,168]. Међутим, ако на величину и стабилност агрегата утичу и концентрација IgG и време загревања на 63 °C, није искључено да би се променом начина припреме агрегираног IgG и/или додавањем албумина као протеина стабилизатора [167,168] успешно добили стабилни агрегати који би се позиционирали у зонама веће

густине сахарозе. За малу количину протеина детектовану у фракцији 32, тј. у талогу се претпоставља да представљају стабилне агрегате формиране у нашим експерименталним условима (1 mg/mL IgG; 10 min на 63 °C).

#### 5.1.2.4. Гел филтрација IgG агрегираног топлотом

Величина агрегираних IgG је анализирана гел филтрацијом на *Sephacryl S-300* матриксу (опсег раздвајања: 10-1500 kDa за глобуларне протеине), уз примену маркера (плави декстран молекулске масе 1000 kDa). Такође, величина ових агрегата је упоређена са величином агрегата албумина. Резултати приказани на слици 5.12, показују да су се IgG елуирали у форми једног оштрог пика, са максимумом апсорпције детектованим у шестом милилитру елуента. Препарат агрегираног албумина је елуиран у форми једног ширег пика, са максимумом апсорпције у деветом милилитру елуента, што показује да је гел филтрација била довољно осетљива да детектује разлику у масама IgG и албумина. На основу позиције маркера гел филтрације, може се закључити да у препарату агрегираног IgG нема молекулских врста (агрегата) већих од 1000 kDa.

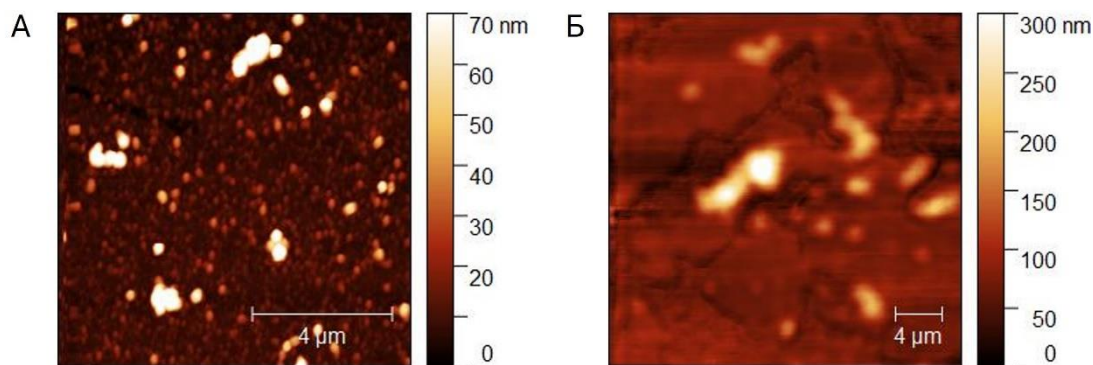


**Слика 5.12.** Гел филтрација на *Sephacryl S-300* матриксу:  
Фракционисање агрегираног IgG и агрегираног албумина  
Плава стрелица – почетак елуирање плавог декстрана тежине 1000 kDa

Добијени резултати нису упоредиви са резултатима ултрацентрифугирања, ни са резултатима фотон корелационе спектроскопије.

### 5.1.2.5. AFM анализа величине и структуре нативног IgG и IgG агрегираног топлом

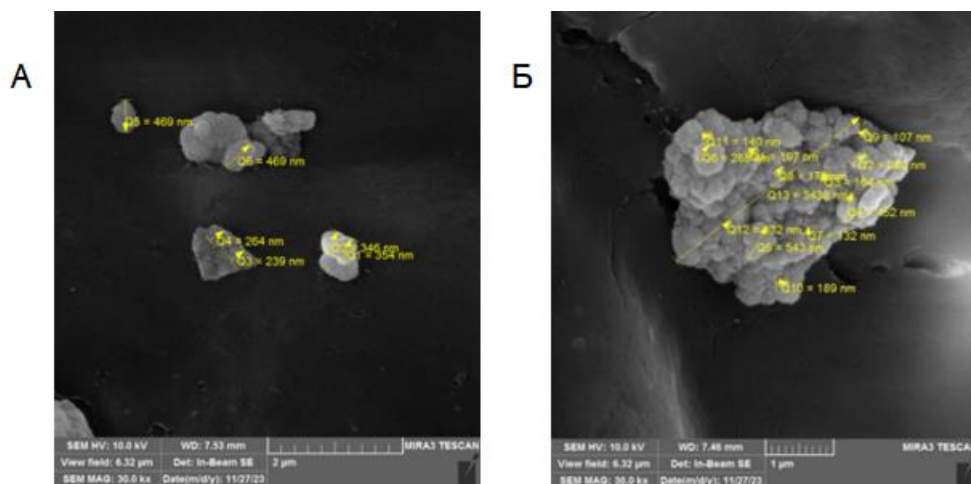
AFM анализом је показано да честице у препарату нативног IgG имају просечну величину  $45,3 \pm 22,68$  nm, док су честице у препарату IgG агрегираног топлом веће просечне величине која износи  $99,18 \pm 40,53$  nm.



Слика 5.13. AFM анализа нативног (А) и агрегираног IgG (Б)

### 5.1.2.6. SEM анализа величине и структуре нативног IgG и IgG агрегираног топлом

SEM анализом добијени су подаци о морфологији и величини нативних и агрегираних молекула IgG. У препарату нативних IgG све детектоване структуре су биле приближно истих облика и просечног пречника 356 nm (слика 5.14А). У препарату агрегираних IgG детектоване су структуре 10 пута већег пречника (3484nm) (слика 5.14Б).



Слика 5.14. SEM анализа нативног (А) и агрегираног IgG (Б)

Иако се и SEM и AFM наводе како методе за анализу структуре и величине имунокомплекса [82], пречници нативних и агрегираних IgG молекула детектовани овим методама су већи од оних детектованих фотон корелационом спектроскопијом, што је последица денатурације и следствене агрегације молекула IgG до којих долази током припреме узорка за микроскопске анализе.

На основу добијених резултата мерења величина честица различитим методама (ултрацентрифугирање на градијенту сахарозе, гел филтрација, микроскопске методе) може се закључити да све наведене методе дају значајне, али различите информације о величини честица. Међутим, ове методе не омогућавају добијање прецизне дистрибуције величина честица због потребе за специфичним припремама узорака и дуготрајне процедуре које могу да доведу до денатурације протеина и/или разграђивања реверзибилно формираних агрегата. Стога је резултат ових метода неопходно потврдити другим, софистициранијим методама, које не захтевају комплексну припрему узорака и који омогућавају анализу протеина и њихових агрегата у нативној конформацији. Наши резултати показују да је фотон корелациона спектроскопија једна од таквих метода.

Резултати овог дела истраживања су недвосмислено показали да је фотон корелационом спектроскопијом могуће за релативно кратко време анализирати величину колоидних честица у препаратима нативних и агрегираних IgG.

### 5.1.3. Анализа величине и структуре *in vitro* формираних имунокомплекса фотон корелационом спектроскопијом

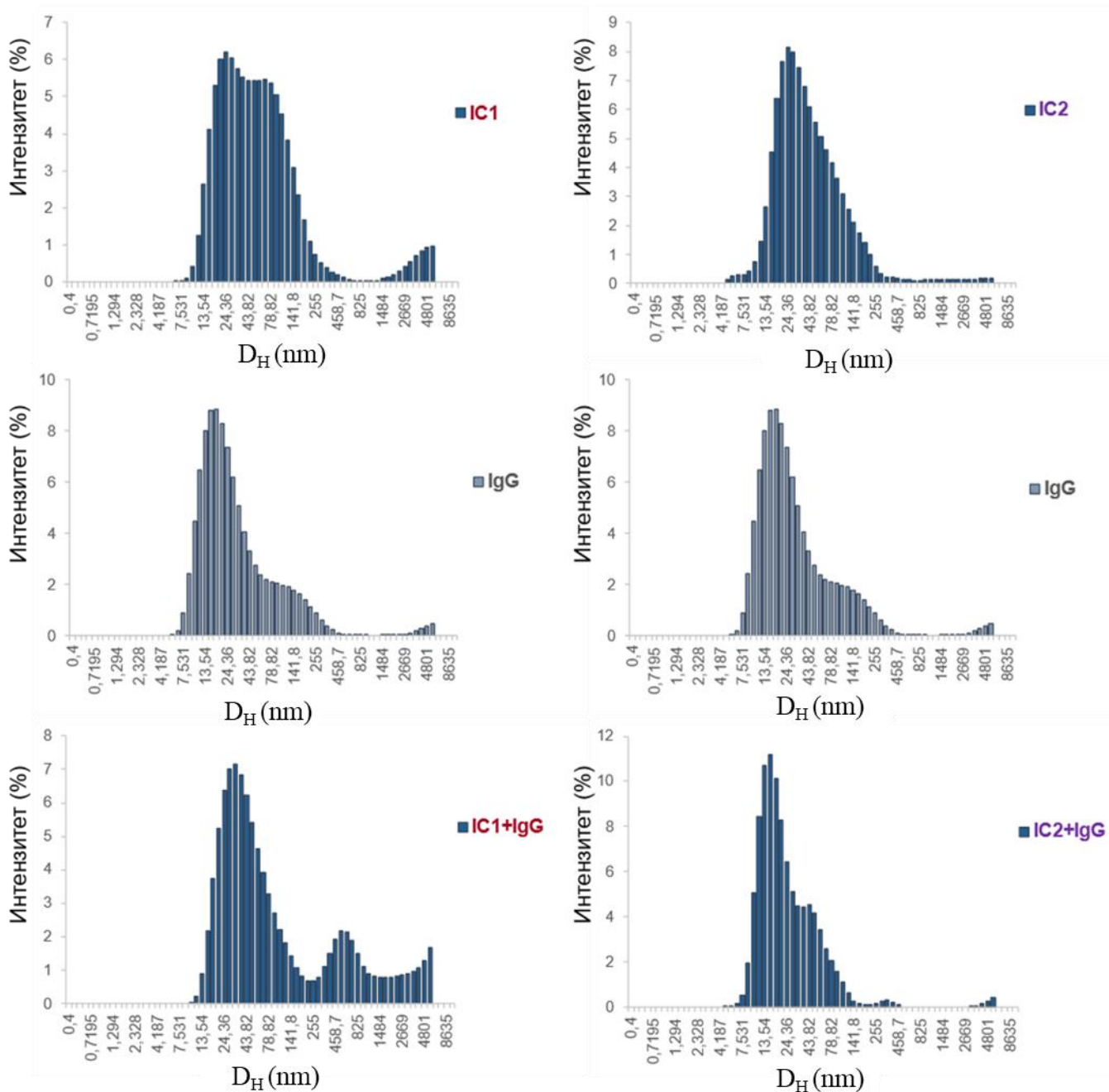
Имунокомплекси су реверзибилно формиране структуре и познато је да се њихова величина у *in vitro* условима, али и *in vivo* може мењати уз додатне количине антигена или антитела [169]. Ова динамична промена величине имунокомплекса, која зависи од односа локално присутних антигена и антитела и која се непрестано дешава на месту инфламације или у лимфним ткивима, је од значаја за остваривање њихових биолошких ефеката. Поред тога, праћење промене величине имунокомплекса је од значаја за праћење и предикцију тока неких инфективних/аутоимуних болести или неких форми физиолошких одговора организма [170]. Без обзира на наведени значај, анализа промене величине имунокомплекса при промени односа антиген: антитело се не ради за потребе клиничке дијагностике, пре свега због методолошких ограничења. Осим наведених „природно“ формираних имунокомплекса било би веома битно анализирати и динамику промене величине имунокомплекса који се стварају као одговор на терапеутска антитела, а које би биле од значаја за предикцију терапеутских или нежељених ефеката ових антитела.

Да би се испитала могућност примене фотон корелационе спектроскопије за анализу утицаја односа антиген:антитело на промену величине имунокомплекса у овој студији су најпре *in vitro* формиран имунокомплекс између IgG (антиген) и мишјег моноклонског антитела реактивног са к лаким ланцима имуноглобулина у односу 1:2 (имунокомплекс означени као *in vitro* IC1) и 1:3 (имунокомплекс означени као *in vitro* IC2). Тако добијени имунокомплекси су анализирани фотон корелационом спектроскопијом. Један од циљева ове дисертације је био утврдити да ли је овом методом могуће пратити и динамичку промену величине имунокомплекса зависно од промене количине конституената. Због тога је IgG узорак додат у IC1 и IC2, након чега су и новоформиран имунокомплекс (IC1+IgG и IC2+IgG) поново анализирани истом методом.

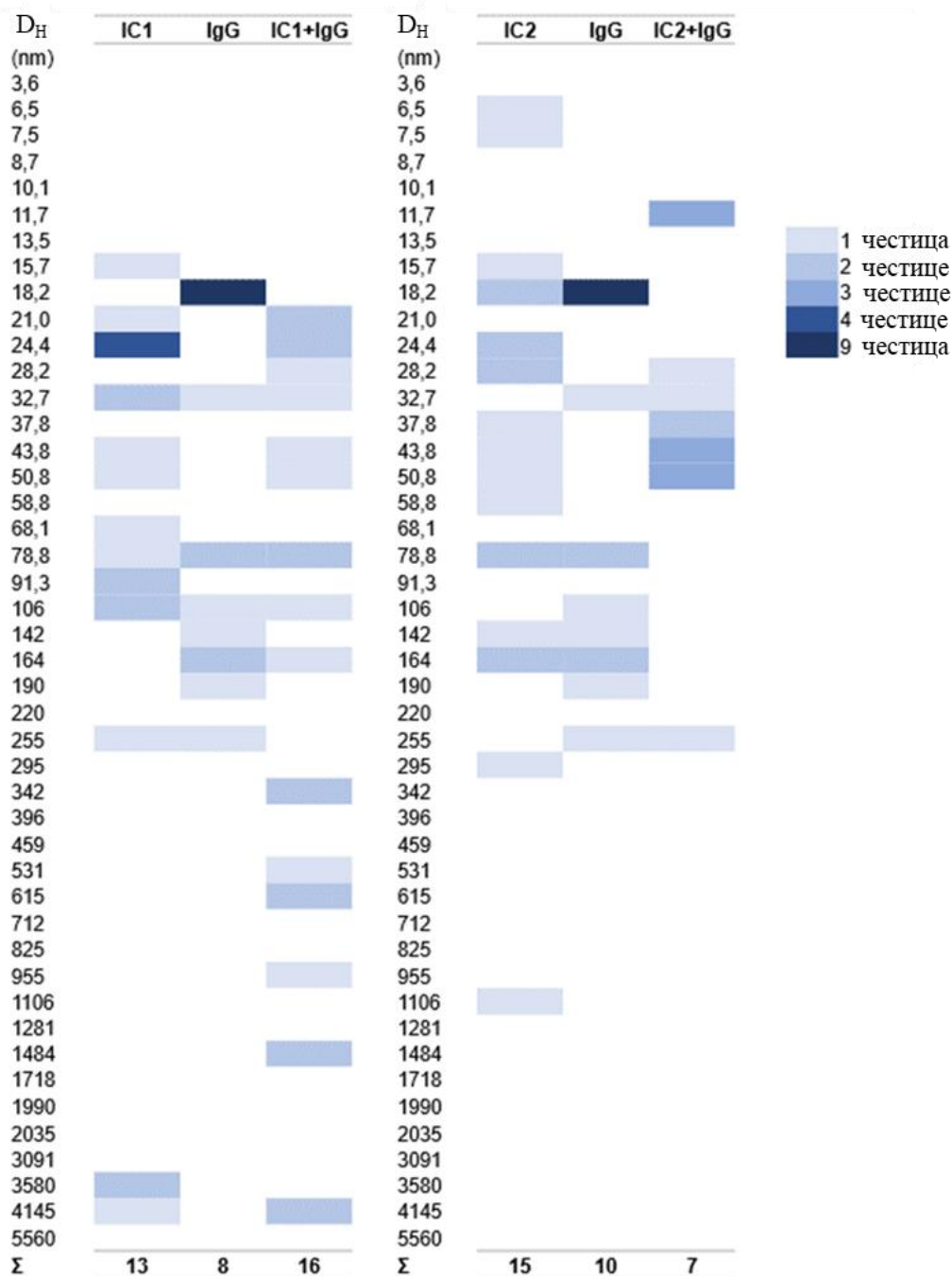
Резултати фотон корелационе спектроскопије су приказани као зависност процента расуте светлости од пречника честица (слика 5.15). Могуће је уочити разлике у дистрибуцији колоидних честица у IC1 и IC2, и детектовати промену величине у честица након додавања антигена (IC1+IgG и IC2+IgG). Затим су резултати изражени као зависност броја честица од њихове величине тј. хидродинамичког пречника (слика 5.16). Показано је да се у IC1 узорку налазило 13 различитих типова честица, при чему је већина честица заступљена у распону пречника од 15 до 255 nm. Након додавања антигена (IgG у коме су доминантне биле честице од 18,2 nm) детектовано је 16 типова честица, при чему шест од њих - пречника од 255 nm до 1484 nm, није детектовано ни у IC1 ни у узорку IgG. У IC2 је идентификовано укупно 15 типова честица, при чему



је већина честица акумулирана у опсегу пречника од 15,7 nm до 164 nm. Након додавања антигена (IgG), број типова честица је смањен на 7, а већина њих је била пречника 28-50 nm.



**Слика 5.15.** Анализа величине колоидних честица у имунокомплексима формираним *in vitro* између IgG (антиген) и мишјег моноклонског антитела реактивног са к лаким ланцима имуноглобулина човека фотон корелационом спектроскопијом. Резултати су приказани као зависност процента расуте светлости од пречника честица средња вредност десет мерења.  $D_H$  (nm): хидродинамички пречник колоидних честица.



**Слика 5.16.** Број честица одређен фотон корелационом спектроскопијом у имунокомплексима формираним *in vitro* између IgG (антиген) и мишјег моноклонског антитела реактивног са к лаким ланцима имуноглобулина човека  
 $D_H$  (nm): хидродинамички пречник колоидних честица

Резултати овог дела истраживања показују да је фотон корелационом спектроскопијом било могуће детектовати прецизне промене у дистрибуцији величине честица у имунокомплексима које су зависне од односа антигена и антитела, као и да је било могуће детектовати промене дистрибуције честица након промене односа антигена и антитела.

Ови резултати отворили су могућност за примену ове методе у даљим фазама истраживања, за анализу величине честица у имунокомплексима који се природно

стварају у физиолошким или патолошким стањима или се формирају као одговор на терапеутска антитела. Брзина извођења и прецизност чине ову методу супериорном у анализи величине имунокомплекса у односу на друге методе које имају одређена методолошка ограничења.

## 5.2. Анализа величине и структуре СИС здравих особа и особа са РА

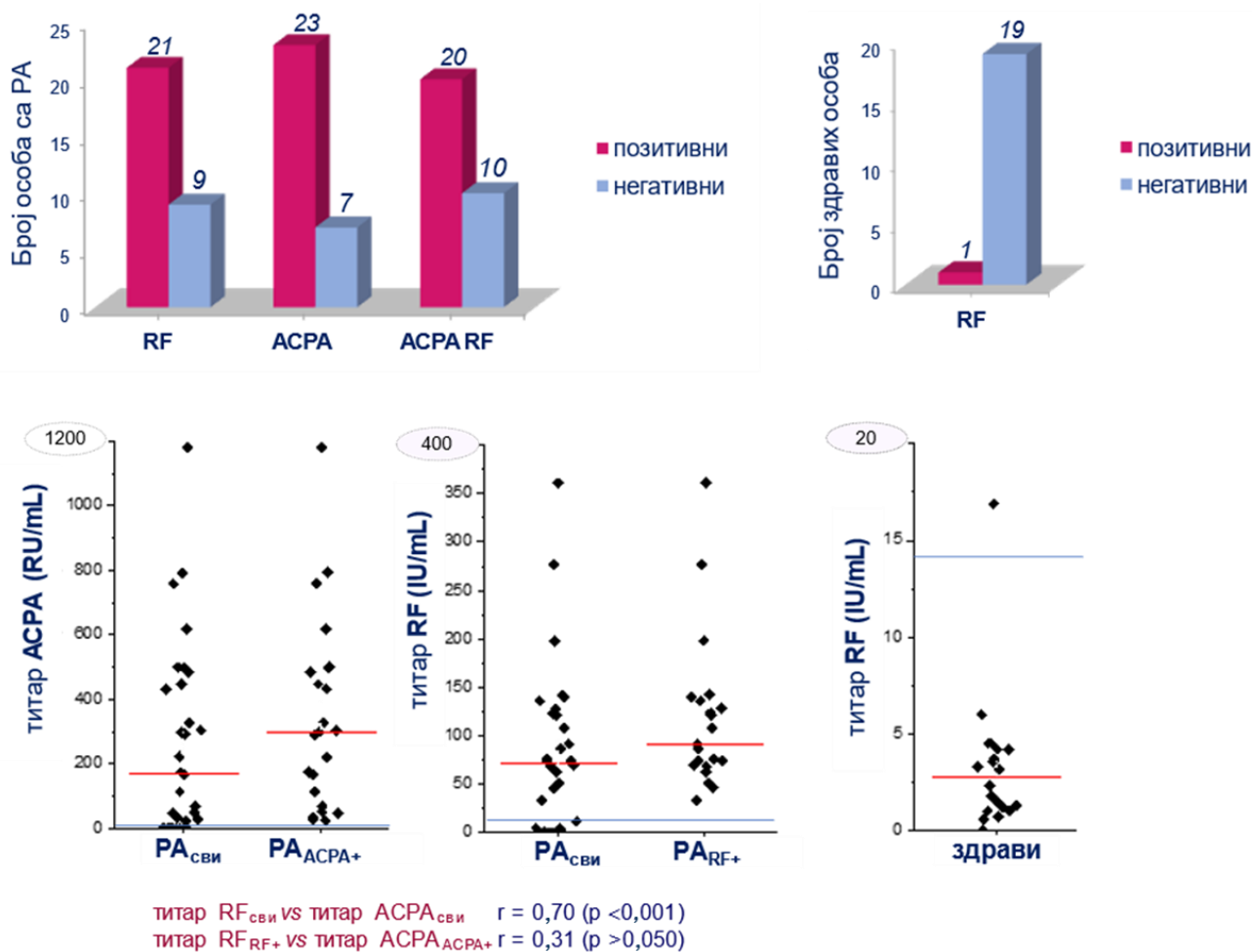
У резултатима приказаним у претходним поглављима потврђено је да је могуће прецизно анализирати величину колоидних честица у саставу *in vitro* аналога имунокомплекса (IgG агрегираних), да је могуће детектовати разлику у величини колоидних честица *in vitro* формираних имунокомплекса при различитом односу антигена и антитела, као и да је могуће пратити динамичку промену величине ових имунокомплекса до које долази због промене односа антигена и антитела. У овој фази истраживања анализирана је величина честица које улазе у састав СИС изолованих из серума периферне крви особа са РА, болести за чији настанак и прогресију су одговорни између осталог и имунокомплекси. Поредиши дистрибуцију величине честица СИС комплекса здравих и болесних особа могуће је дефинисати величине честица које се појављују само код оболелих. Такође, циљ је наћи везу између величина честица и садржаја имуноглобулина, као главних молекулских конституената СИС комплекса.

Познато је да концентрација имунокомплекса у синовијалној течности особа са РА може да буде виша од њихове концентрације у периферној крви, али и да ниво имунокомплекса у периферној крви не мора бити повишен, нарочито у раним фазама болести [57-60]. Ипак, у овом истраживању анализирани су величине честица у имунокомплексима периферне крви, а не у имунокомплексима синовијалне течности, зато што узорковање синовијалне течности представља инвазивнију процедуру од рутинског вађења периферне крви. У састав имунокомплекса у циркулацији (тј. СИС) улазе и имунокомплекси који „цуре“ из ткива под инфламацијом, и као такви они су добар модел за изучавање структуре и функције имунокомплекса које је тешко, или није могуће изоловати са места инфламације [171]. Такође, познато је да и најмање промене у структури имунокомплекса могу да утичу на њихове функционалне карактеристике, што указује на потребу анализе структуре имунокомплекса, чак и када им концентрација није повишена [61]. У овој студији није анализирана још једна специфична категорија имунокомплекса који се у периферној крви људи налазе везани за еритроците преко рецептора за С3 компоненту комплемента (CR1 receptor; CD35), и који се на тај начин уклањају из циркулације методом имуноадхеренце. Иако су резултати бројних истраживања повезали ову категорију имунокомплекса са аутоимуним (системски лупус, реуматоидни артритис, инсулин зависни дијабетес мелитус, итд.) и инфективним болестима (маларија, туберкулоза, итд.) [172], величина колоидних честица у њиховом саставу није анализирана у овој студији, пре свега зато што је њихово изоловање компликовано, па се њихов ниво не анализира ни за потребе рутинске дијагностике наведених болести.

У овом истраживању анализирани су СИС изоловани из серума периферне крви 30 особа са РА и 30 здравих особа (контролна група) који по старости одговарају особама са РА преципитацијом помоћу 3% PEG. Подаци за ниво RF и АСРА аутоантитела у серумима, вредности основних клиничких параметара (брзине седиментације еритроцита, нивоа CRP и степена активности болести - DAS 28), као и терапије које су примали у време узорковања крви су дати су у табели П1, у Прилогу ове дисертације, а сумарни приказ нивоа аутоантитела дат је на слици 5.17. На основу присуства АСРА и RF у серумима, особе са РА су подељене у две групе: АСРА+ RF+ (20 особа) и АСРА-RF- (6 особа). Поред наведених, три особе су у својим серумима имале само АСРА, али не и RF- (АСРА+RF-), док је једна особа у свом серуму имала само RF, али не и АСРА (АСРА-

RF+). Ни један од испитаника са РА није примао терапијска моноклонска антитела, чије присуство би могло да утиче на дистрибуцију величине честица у СИС.

Испитаници који су формирали контролну групу нису имали акутне инфекције најмање месец дана пре узимања крви. Такође нису имали ни документоване системске болести. Старост и пол ових испитаника као и ниво RF у серумима су дати у табели П2. С обзиром на то да пролазан пораст нивоа RF може да буде део нормалног имунског одговора на неки антиген, измерен је и ниво RF у 20 серума здравих особа. У 19 од 20 анализираних узорака ниво RF је био нижи од граничне вредности примењеног теста (14 IU/mL), а само у једном узорку је био само незнатно виши од нивоа граничне вредности (16,9 IU/mL) (табела П2, слика 5.17), тако да се контролна група сматрала одговарајућом за ову студију.



Слика 5.17. RF и АСПА у серумима особа са РА и RF у серумима здравих особа.

Црвена линија: медијана за вредности титра RF и АСПА. Плава линија: граничне вредности за титре аутоантитела. RF - гранична вредност теста: 14 IU/mL, узорак са вредностима мањим 14 IU/mL се сматра RF негативним; АСПА: гранична вредност теста: 5 RU/mL; узорак са вредностима мањим 5 IU/mL се сматра АСПА негативним. Титри RF и АСПА су одређени за свих 30 особа са РА. Код здравих особа титар RF је измерен у серумима 20 од 30 испитаника, а титар АСПА није одређиван. Нумерички подаци за слику дати су у Прилогу, табеле П1 и П2.

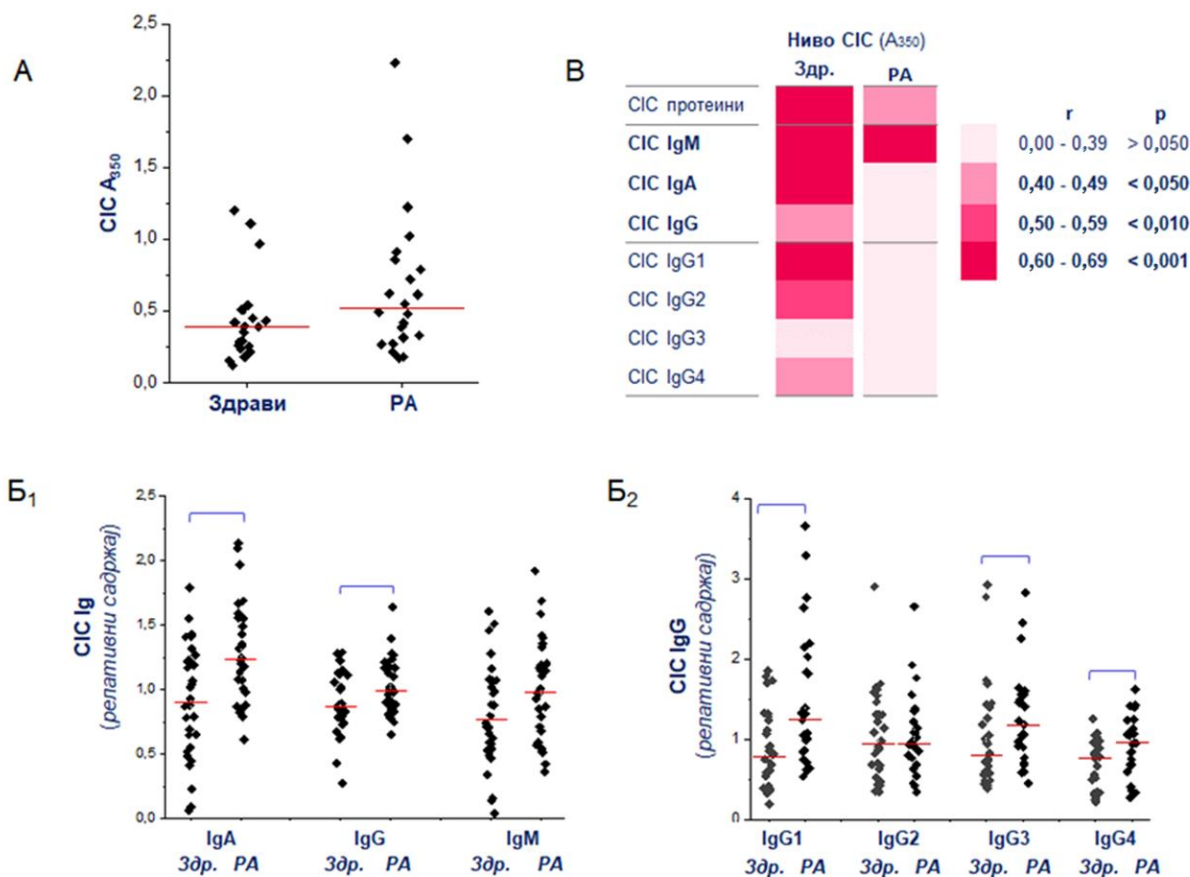
### 5.2.1. Ниво и садржај имуноглобулина у СИС особа са РА и здравих особа

Постоји релативно велики број метода за изоловање и одређивање нивоа имунокомплекса [173], при чему су у овој студији анализирани величине честица које улазе у састав СИС изолованим селективном РЕГ преципитацијом високе молекулске масе. Иако је одавно познато да РЕГ не преципитира све категорије имунокомплекса [144] и да поред имунокомплекса (тј. имуноглобулина агрегираних антигена) може да таложи и друге серумске протеине [142,143] овај метод је изабран, јер се преципитација РЕГ користи када је потребно не само квантификовати имунокомплексе већ и одредити њихов састав и анализирати њихову функцију [88, 132,174,175]. Такође, познато је да од концентрације полиетилен гликола зависе величина [176], састав и количина [177,178] преципитираних имунокомплекса. У овој студији преципитација је урађена раствором полиетилен гликола концентрације 3%, јер се овај метод најчешће користи у дијагностици као скрининг тест за откривање повишеног нивоа СИС [140,173]. Још један разлог за одабир ове методе је био и то што су Poulton и сар. (1983) гел филтрационом хроматографијом показали присуство већег броја колоидних честица различите величине у РЕГ преципитабилним имунокомплексима у неким малигним болестима људи, што је дало основу за анализу величине ових честица код РА применом фотон корелационе спектроскопије [141].

Резултати добијени у овој студији су показали да се ниво СИС (изражен као  $A_{350}$  ресуспендованих РЕГ преципитата) особа са РА ( $0,593 \pm 0,457$ ; медијана:  $0,407$ ) није статистички значајно разликовао од нивоа СИС изолованих из серума здравих особа ( $0,464 \pm 0,307$ ; медијана:  $0,450$ ) (Слика 5.18А). Индивидуални нивои СИС дати су у табели П1.

Применом дот блот есеја показано је присуство IgA, IgG, и IgM, као и све четири подкласе IgG, у свим анализираним СИС. Такође, потврђено је да су СИС особа са РА, у односу на здраве особе, садржале више IgA и IgG, али не и IgM (Слика 5.18Б<sub>1</sub>, табела П1). Повећан ниво укупног IgG је био последица повећања нивоа IgG1, IgG3 и IgG4, али не и IgG2 (Слика 5.18Б<sub>2</sub>, табела П1). Корелациона анализа је показала да у контролној групи ниво СИС позитивно корелирао са нивоом свих испитиваних класа имуноглобулина и свих IgG подкласа, с изузетком IgG3. С друге стране у групи РА показано је да је ниво СИС позитивно корелирао само са садржајем IgM ( $r = 0,65$ ,  $p < 0,001$ ) (Слика 5.18В).

У групи РА особа анализираних у овом раду, ниво RF и АСРА аутоантитела у серумима није утицао на ниво СИС ( $A_{350}$  за СИС АСРА+RF+ је износио  $0,602 \pm 0,386$  /медијана  $0,508$ / док је  $A_{350}$  за СИС АСРА-RF-  $0,671 \pm 0,705$  /медијана  $0,370$ ). У анализираној групи особа са РА ниво СИС није статистички значајно корелирао са активношћу болести (тј. вредностима DAS28), нити са анализираним параметрима инфламације (брзином седиментације еритроцита и нивоом CRP). Такође ни примењена терапија (метотрексат и преднизон / метотрексат, преднизон и лекови из групе *disease-modifying antirheumatic drugs* - DMARDs / метотрексат и DMARDs) се није могла повезати са нивоом СИС ( $p=0,73$ ). Одсуство утицаја присуства RF и АСРА на ниво СИС, као и одсуство корелације клиничких параметара и терапије са нивоом СИС потврђује да се у анализираној групи особа са РА индивидуалне варијације нивоа СИС могу сматрати последицом њихових структурних одлика, а не утицајем наведених фактора. Због тога се ови СИС узорци могу сматрати добрим моделом за анализу у овој студији.



Слика 5.18. Ниво C1C (A), релативни садржај IgA, IgG и IgM (Б<sub>1</sub>) и подкласа IgG (Б<sub>2</sub>) у C1C особа са РА и C1C здравих особа и корелација нивоа C1C и релативног садржаја имуноглобулина (B)

Црвена линија: медијана. *Хоризонтална линија* – статистички значајна разлика између C1C особа са РА и C1C здравих особа. Нумерички подаци за слику дати су у Прилогу, табеле П1 и П2.

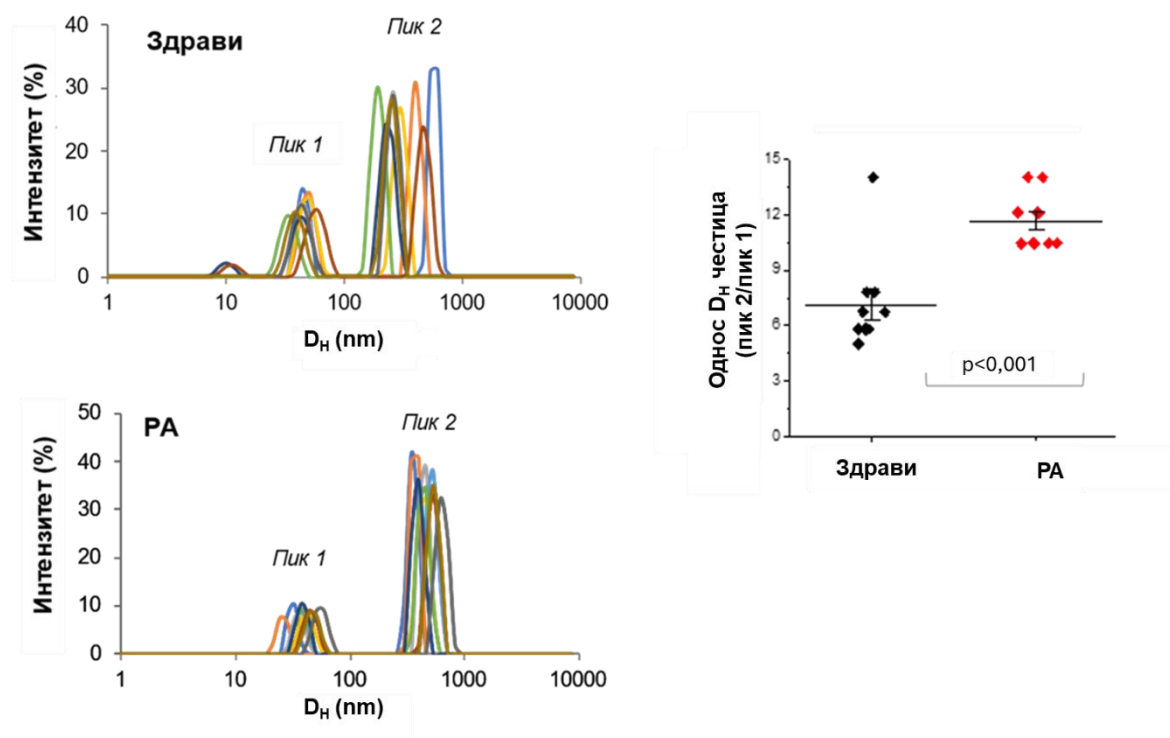
## 5.2.2. Анализа величине колоидних честица C1C здравих особа и особа са РА фотон корелационом спектроскопијом

### 5.2.2.1 Анализа величине колоидних честица у збирним узорцима C1C

Имуноглобулини, који су основни „градивни елемент“ имунокомплекса, су изузетно хетерогена група макромолекула (у циркулацији се налази  $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^9$  различитих молекулских форми антитела; [10]) што, заједно са великом хетерогеношћу и осталих молекулских конституената имунокомплекса [88], резултује у великим индивидуалним варијацијама у саставу C1C. Да би се смањило ефекат ове природне хетерогености, пре анализе индивидуалних C1C, анализирани су збирни узорци C1C здравих особа и особа са РА. Да је овај приступ валидан потврдили су резултати [4], где је методом фотон корелационе спектроскопије у збирним узорцима афинитетно изолованих IgG и IgM имунокомплекса, показано присуство колоидних честица различите величине.

Резултати анализе фотон корелационом спектроскопијом су показали да узорци C1C имају изузетно висок индекс полидисперзности (контрола:0,96; РА:0,86) што показује да се у њима налазе честице широке расподеле величина. У збирним узорцима

СИС здравих особа и СИС особа са РА честице су, на основу величине, груписане у два велика скупа, али је расподела величина СИС честица особа са РА била хомогенија него код здравих особа (слика 5.19, табела 5.3). У СИС особа са РА средња вредност пречника прве групе честица је износила  $41 \pm 8$  nm (медијана 38 nm) и није се статистички значајно разликовала од средње вредности пречника ове групе честица у СИС здравих особа ( $43 \pm 10$  nm; медијана 44 nm). Међутим, средња вредност пречника друге групе СИС честица особа са РА је износила  $308 \pm 142$  nm (медијана 255 nm) и била је статистички значајно већа од оне у СИС здравих особа ( $472 \pm 25$  nm, медијана 459 nm) ( $p=0,006$ ). Однос пречника честица друге и прве групе је код здравих особа износио  $7,1 \pm 2,5$ , док је код особа са РА био значајно већи ( $p<0,006$ ) и износио је  $11,7 \pm 1,5$  (слика 5.19, табела 5.3).



**Слика 5.19.** Анализа величине колоидних честица у збирним узорцима СИС особа са РА и СИС здравих особа фотон корелационом спектроскопијом  
 Резултати су приказани као зависност процента расуте светлости од пречника честица.  $D_H$  (nm): хидродинамички пречник колоидних честица.

**Табела 5.3.** Величина колоидних честица у збирним узорцима СИС здравих особа и особа са РА одређена фотон корелационом спектроскопијом

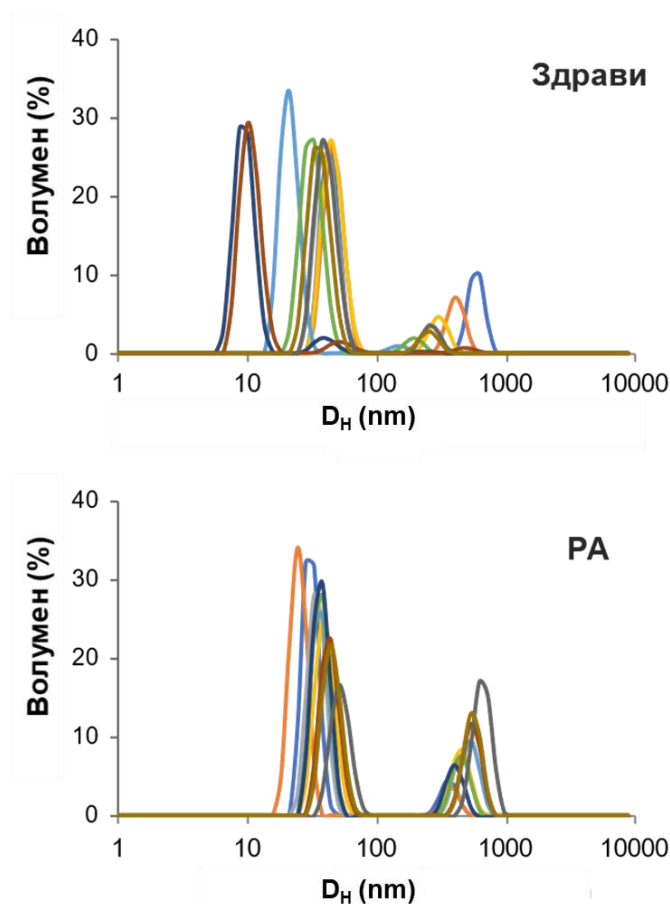
D <sub>n</sub> (nm)	Здрави	РА
	Број поновака у 10 мерења	
7,73		
11,7	1	
13,5	1	
15,7		
21,0		
24,4	1	1
32,7		1
37,8	2	4
43,8	2	2
50,7	4	1
58,8	1	1
68,1		
106		
142		
164	2	
190		
220	2	
255	2	
342	1	1
396	1	2
459		3
531	1	4
955		
1280		
1480		
1720		
1990		
4150		
5560		
Типови честица	13	10

D<sub>n</sub> (nm)- хидродинамички пречник колоидних честица  
 Типови честица: Број честица различитог хидродинамичког пречника

Када су подаци представљени као зависност запреминског удела честица од њихове величине уочава се да је код СИС здравих особа и СИС особа са РА највећи удео честица прве групе (91,6 и 88,5%, редом), тј. честица мањих од 100 nm (слика 5.20). Треба нагласити да трансформација резултата мерења из удела интензитета расуте светлости у запремински удео није једноставна и да оптичка својства мерених честица (стварне и имагинарне компоненте индекса преламања) морају бити позната како резултати не би били погрешно интерпретирани [179], посебно приликом анализе сложеног система као што је СИС. У литератури постоје подаци о методама израчунавања релативног индекса преламања и моделовању СИС система [23]. Међутим, у овом истраживању нису примењиване ове методе, јер је дистрибуција запремине изведена из мерења интензитета расуте светлости коришћена само у сврху поређења и за процену релативних количина мултимодалних дистрибуција величина, пре свега по препоруци произвођача коришћеног инструмента [180], и као што је наведено у раду Faggiano и сар. (2010) [181]. У овом истраживању, као параметар мерења фотон корелационом спектроскопијом, коришћена је вредност рефракторног индекса воде (RI<sub>H2O</sub> = 1,33) имајући у виду да протеински раствори ниске концентрације (као што су СИС колоидни системи са



протеинима као главним конституентима) имају вредности рефракторног индекса блиске рефракторном индексу воде [135].

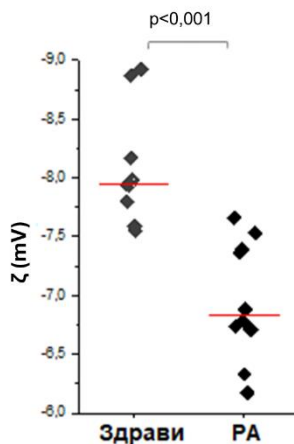


**Слика 5.20.** Фотон корелациона спектроскопија: Анализа величине колоидних честица у збирним узорцима СИС особа са РА и СИС здравих особа  
Резултати су приказани као зависност запреминског удела честица од пречника.  $D_H$  (nm): хидродинамички пречник колоидних честица.

Према нашим сазнањима, резултати приказани у овом поглављу представљају прве резултате мерења величине СИС фотон корелационом спектроскопијом. György и сар. (2011) су методом фотон корелационе у збирним узорцима афинитетно изолованих IgG имунокомплекса синовијалне течности болесника са реуматоидним артритисом идентификовали честице величине 4, 210 и 2000 nm, а у узорцима афинитетно изолованих IgM имунокомплекса детектовали су честице величине 12, 40, 210 и 2100 nm [4]. Неслагања између величине честице у имунокомплекса између поменуте и овог истраживања могу да буду последица различитих структурних одлика имунокомплекса серума периферне крви у односу на оне из синовијалне течности или могу бити последица коришћења различитих метода за изолацију СИС. Наши резултати [182] указују да би и разлика у годинама учесника ове студије и студије György и сар. (2011) могла бити разлог за неслагање у величини честица које улазе у састав СИС.

Непосредно након анализе збирних СИС узорка фотон корелационом спектроскопијом, на истом апарату одређен је и њихов  $\zeta$  потенцијал. Резултати су показали да је  $\zeta$  потенцијал СИС пацијената са РА износио  $-6,95 \pm 0,51$  mV и био је значајно нижи  $\zeta$  потенцијал СИС здравих особа који је износио  $-8,07 \pm 0,47$  mV (слика 5.21). Овакви резултати указују да РА може да буде праћен и смањењем колоидне

стабилности имунокомплекса, која може бити последица различитих фактора [84], и између осталог њиховог различитог имуноглобулинског састава. Знајући да способност агрегације различитих молекуларних варијанти имуноглобулина није иста [183,184], уочене разлике у величини СИС честица могу бити, барем делимично, резултат откривених разлика у саставу изотипова имуноглобулина (слика 3.19) и присуство других молекула специфичних за болест или старост испитаника [185].



Слика 5.21.  $\zeta$  потенцијал збирних узорка СИС особа са РА и СИС здравих особа

Резултати анализе збирних СИС узорка добијени у овој фази истраживања су показали да је фотон корелационом спектроскопијом било могуће детектовати присуство колоидних честица различитог пречника, и да се пречник честица у узорцима пореклом од особа са реуматоидним артритисом разликовао од оних добијених од здравих особа. Због тога је било оправдано у следећој фази истраживања анализирати појединачне СИС узорке, без обзира на очекивану хетерогеност.

#### 5.2.2.2. Анализа величине колоидних честица у појединачним узорцима СИС здравих особа и особа са РА

Како је у претходној фази истраживања показано да је могуће измерити величину колоидних честица који се налазе у збирним СИС узорцима здравих особа и особа са РА, даљи ток истраживања је усмерен на анализу хидродинамичког пречника колоидних честица у сваком појединачном СИС узорку како би се добила прецизнија слика расподеле величине честица, и елиминисао утицај евентуалне алогене интеракције молекулских конституената СИС различитих донора на резултате мерења величине честица.

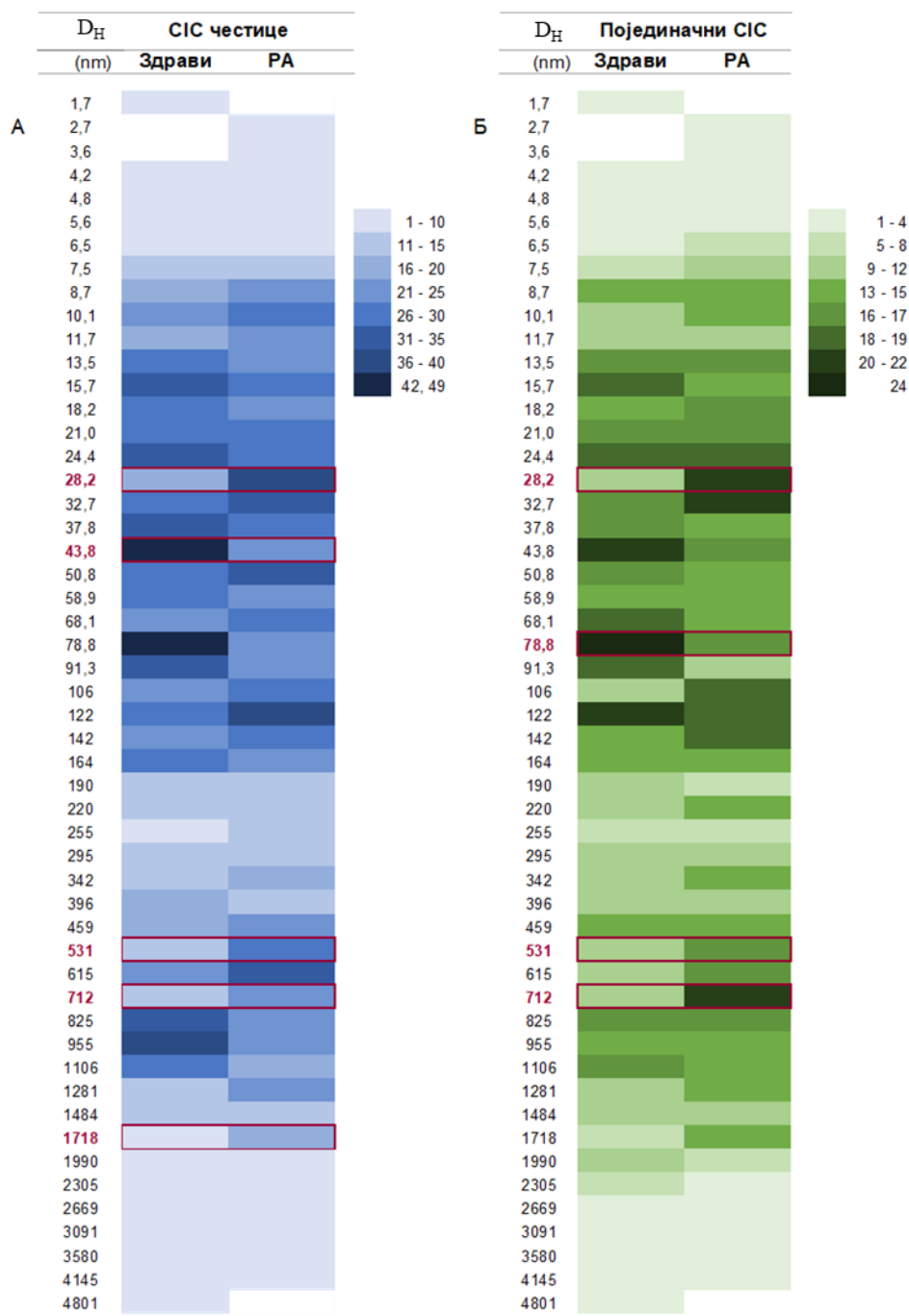
У овој фази рада фотон корелационом спектроскопијом је анализирано свих 30 СИС узорка здравих особа и 30 СИС узорка особа са РА, при чему је сваки узорак измерен 10 пута, тако да је добијено укупно по 300 мерења за сваку групу. Сви измерени подаци засновани на процентуалном интензитету расипања светлости дати су у табелама П3 и П4, у прилогу ове тезе.

У обе СИС групе детектовано је 50 типова честица које су се разликовале на основу свог хидродинамичког пречника (слика 5.22А). У СИС узорцима контролне групе детектовано је укупно 944 честица, просечно 3,15 честица по снимку. У СИС РА групи забележено је 938 честица, просечно 3,13 честица по снимку. Број честица детектован у индивидуалним СИС узорцима особа са РА се кретао у опсегу од 20 до 46, што је просечно износило  $31 \pm 7$  (медијана 32) (слика 5.22А). Број честица у СИС контролне групе није се разликовао од броја честица у СИС РА, а кретао се у опсегу од 16 до 42, што је просечно износило  $31 \pm 6$  (медијана 32). Независно да ли се радило о СИС узорцима особа са РА или о СИС узорцима здравих особа, у сваком појединачном СИС су током 10 поновљених

мерења неке честице детектоване само једном, а неке регистроване као поновци, тј. регистроване су од два до највише шест пута и истом узорку. У СИС РА, у односу на СИС контролу, није примећен значајна промена броја било ког од ових поновака. (Прилог, слика П1).

У обе испитиване групе могло се уочити да се на основу величине честице групишу у два скупа: први са честицама пречника од 7,5 nm до 164 nm (606 и 594 честица у контролној и РА групи) и други са честицама пречника од 342–1718 nm (229 и 236 честица у контролној и РА групи), (слика 5.22А) што је одговарало резултатима који су добијени анализом збирних узорака СИС (слика 5.19). Најзаступљенија честице у СИС здравих особа је била честица пречника 78,8 nm, док је у СИС у особа са РА најзаступљенија била честица пречника 122 nm. Прелиминарна статистичка анализа (*Mann-Whitney* тест) показала је да се СИС здравих особа и особа са РА значајно разликују у броју честица опсега величине 100-200 nm ( $p=0,001$ ) и 500-750 nm ( $p=0,023$ ). Овакав резултат нам је био основа за даљу статистичку анализу (*Mann-Whitney* тест) која је показала да су СИС особа са РА, у поређењу са СИС контролне групе, садржали значајно већи број честица пречника од 28,2, 531, 712, и 1718 nm. Истовремено присуство ове четири честице детектовано је у само четири узорка СИС особа са РА. Исти статистички тест је показао да СИС особа са РА садрже мањи број честица са пречником од 43,8 nm у поређењу са СИС контролне групе (слика 5.22А, Прилог, табела П5).

У следећем кораку *Fisher's exact* тестом испитивано је да ли се у анализираној групи особа са РА, у односу на контролну групу, налази различит број особа чији СИС садрже честицу одређене величине. Примена овог теста је била потребна јер су разлике у броју честица детектоване *Mann-Whitney* тестом могле бити последица накупљања честица одређене величине (тј. поновака честица) у мањем броју СИС и нису представљале карактеристику целе анализиране групе. *Fisher's exact* тест је показао да постоји значајно већи број особа у РА групи у односу на здраве особе чији су СИС садржали честице полупречника 28,2, 531 и 712 nm. Применом истог теста добијени су резултати који су показали да су се само СИС који садрже честице пречника од 78,8 nm чешће јављали код особа у контролној у односу на РА групу (Слика 5.22Б; Прилог, табела П5).



**Слика 5.22.** Дистрибуција величине колоидних честица CIS особа са РА и здравих особа одређена фотон корелационом спектроскопијом; А) Укупан број снимљених честица одређене величине; Б) Број индивидуалних CIS узорака у којима су детектоване честице одређене величине

Црвеном бојом су означене честице које су у статистички значајно различитом броју биле присутне у CIS РА у односу CIS здравих особа. Нумерички подаци за слику су дати у Прилогу, табела П5.

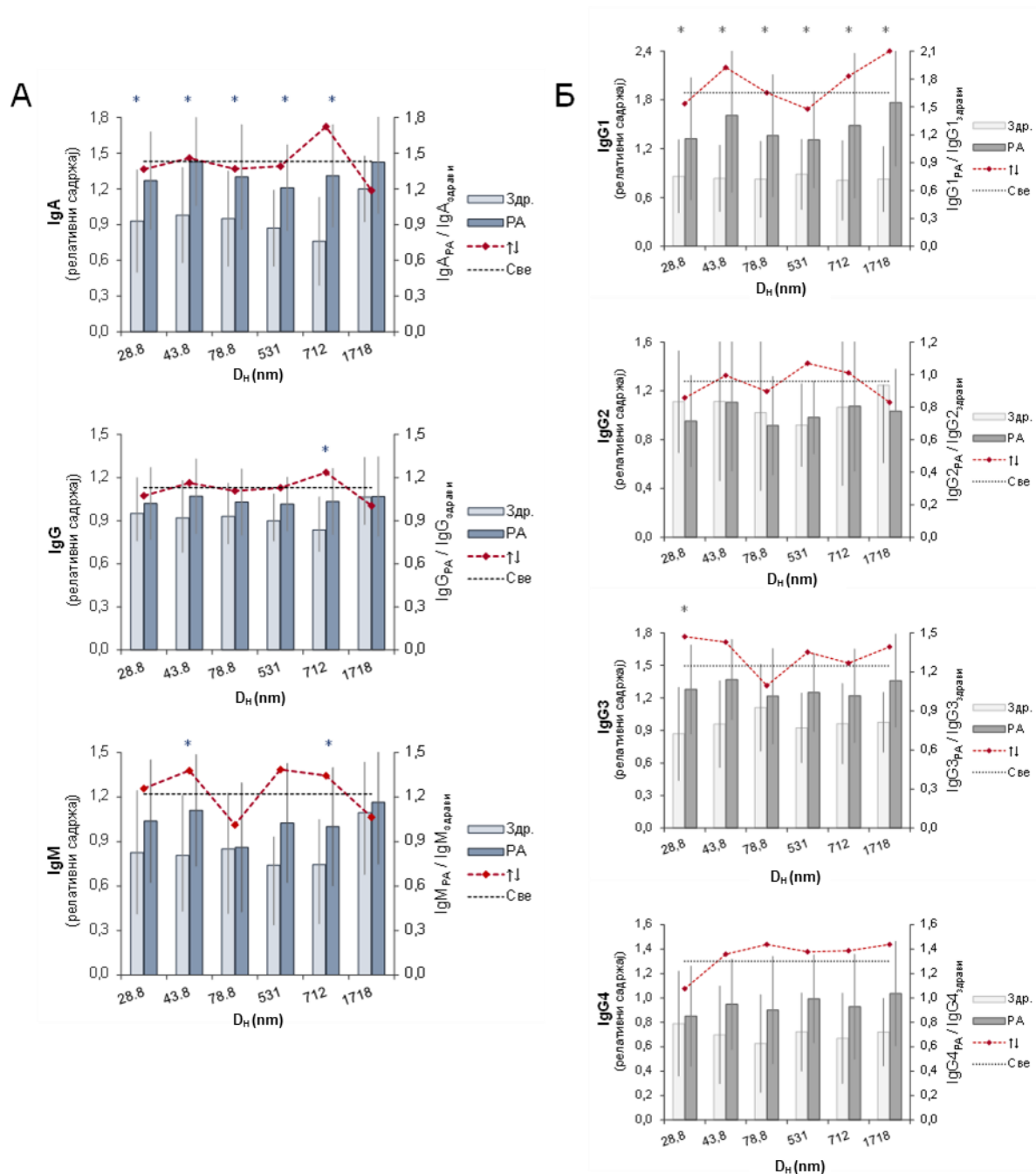
### 5.2.2.2.1. Повезаност величине колоидних честица и IgA, IgG и IgM антитела у СИС популацији особа са РА и здравих особа

Након одређивања дистрибуције величине честица у индивидуалним СИС узорцима (слика 5.22), а знајући релативни садржај имуноглобулинских класа и подкласа у свим анализираним СИС (слика 5.18) фокус даљег истраживања је био да се потврди или оповргне претпоставка да постоји повезаност између дистрибуције величине СИС честица и концентрације имуноглобулина која је измерена у њима.

У првом кораку овог дела истраживања испитивано је да ли постоји статистички значајна разлика у нивоу IgA, IgG и IgM класа и подкласа IgG између СИС особа са РА и здравих особа, а који садрже честице величине 28,8, 43,8, 78,8, 531, 712 и 1718 nm за које је показано да су у статистички значајно различитом броју понављања биле заступљеније у СИС особа са РА у односу на СИС здравих особа. Од ових шест група честица, честице пречника 43,8 и 78,8 nm су биле више заступљене у контролним СИС, а честице величине 28,8, 531, 712 и 1718 nm су биле заступљеније у СИС особа са РА.

Резултати приказани на слици 5.23А показују да је у СИС РА у односу на СИС здравих особа ниво IgA био значајно виши у СИС популацији која садржи неку од наведених честица, с изузетком честице од 1718 nm. Повећање релативног садржаја укупног IgG у РА детектовано је само код СИС који садрже честице од 712 nm, док је IgM био повећан СИС који садрже честице од 43,8 или 712 nm. С обзиром да је промена концентрација укупног IgG последица промене концентрације четири подкласе овог молекула, као и да промене концентрација свих подкласа не морају бити „истог смера“, било је неопходно анализирати повезаност сваке од подкласе IgG са величином наведених честица. Резултати приказани на слици 5.23Б показују да је у СИС РА, у односу на СИС особа контролне групе, ниво IgG1 био значајно виши у СИС који садрже неку од шест честица чија је заступљеност статистички значајна у ове две категорије СИС. Садржај IgG3 је био значајно већи у СИС РА у односу на СИС здраве особе који садрже честице величине 28,8 nm. Повезаност величине честица са порастом/променом/ нивоа IgG2 и IgG4 у СИС у РА није потврђена за групу испитаника који су били укључени у ову студију.

Као главни закључак овог дела истраживања намеће се чињеница да се промене у нивоима имуноглобулина у СИС код РА не подударују са обрасцем расподеле величина честица, показујући различиту експресију између контролне и РА групе. На пример, ниво IgA, IgM и IgG у СИС који садрже честице од 43,8 nm или ниво IgA и IgM и IgG у СИС који садрже честице од 78,8 nm честице је у РА био виши у односу на контролу, без обзира што су ове честице биле заступљеније у контролним СИС. На основу оваквог резултата, одлучено је да се анализира разлика у нивоима имуноглобулина између СИС особа са РА и контролних СИС за све честице које су биле присутне у довољном броју за статистичку анализу, тј. за 43 честице, пречника од 5,6 nm до 2669 nm. Подаци приказани на сликама 5.24 и 5.25 и табелама П6 и П7, показују да је значајно повећан ниво IgA у РА у поређењу са контролним СИС повезано са 28 честица. У поређењу са контролним СИС, значајно повишени ниво укупних IgG у СИС особа са РА је био повезан са осам величина честица (7,5, 18,2, 21,0, 24,0, 220, 396, 712, и 812 nm). Насупрот томе, повећани ниво IgM је био повезан са честицама које имају пречникрадију од 32,7, 43,8, 220, 396, 531 и 1281 nm. Иако се повећан садржај укупног IgG детектовао код осам типова честица, повећан садржај IgG1 је детектован на нивоу 22 типа честица, док је број типова честица које се повезују са променом садржаја IgG био знатно мањи (један, осам и десет типова честица за IgG2, IgG3 и IgG4), при чему ниједна честица није могла бити повезана са променом садржаја све четири подкласе IgG. Интересантно је да је истовремено повећање нивоа IgG, IgA и IgM у РА у поређењу са контролом било повезано само са СИС који садрже честице од 220 и 396 nm.



**Слика 5.23.** Релативни садржај IgA, IgG и IgM (А) и подкласа IgG (Б) у СИС здравих особа и особа са РА, а који у себи садрже честице које се у статистички значајно различитом броју налазе у ове две групе СИС

Ниво имуноглобулина је одређен дот блот анализом. Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm$  стандардна девијација.  $\uparrow\downarrow$  - Однос релативног садржаја имуноглобулина у СИС особа РА, а који садрже честице пречника наведеног у односу на одговарајуће СИС здравих особа; Све - Однос релативног садржаја имуноглобулина у свим анализираним СИС особа РА и контролним СИС. \*- Статистички значајна разлика у нивоу имуноглобулина између СИС особа РА и контролних СИС. Нумерички подаци за слику су дати у Прилогу, табела П6



**Слика 5.24.** Дистрибуција релативног садржаја IgA, IgG и IgM у СИС особа са РА и СИС здравих особа, зависно од хидродинамичког пречника честица,  $D_H$  (nm)

Ниво имуноглобулина је одређен дот блот анализом. Подаци су представљени како однос нивоа IgA, IgG и IgM за СИС особа са РА и СИС здравих особа. Бројеви написани плавом бојом: значајна разлика у нивоу имуноглобулина; Бројеви у сивим пољима: честице које су у статистички значајно различитом броју присутне у СИС особа са РА у односу на контролне СИС. Сиве линије: Два главна скупа честица СИС. Нумерички подаци за слику су дати у Прилогу, табела П6.



**Слика 5.25.** Дистрибуција релативног садржаја подкласа IgG у СИС особа са РА и СИС здравих особа, зависно од хидродинамичког пречника честица,  $D_H$  (nm)

Ниво имуноглобулина је одређен дот блот анализом. Подаци су представљени као однос нивоа IgA, IgG и IgM за СИС особа са РА и СИС здравих особа. Бројеви написани плавом бојом: значајна разлика у нивоу имуноглобулина; Бројеви у сивим пољима: честице које су у статистички значајно различитом броју присутне у СИС особа са РА у односу на контролне СИС. Сиве линије: Два главна скупа честица СИС. Нумерички подаци за слику су дати у Прилогу, табела П7.



С обзиром на ниску преваленцу особа са РА који у својој периферној крви немају детектабилне количине АСРА и RF аутоантитела (тзв. АСРА-RF-), број пацијената укључених у ову студију није био довољан да се са сигурношћу потврди веза између титра серумских АСРА и RF и величине честица у СИС узорцима. Прелиминарна статистичка анализа показала је да је у поређењу са серонегативним РА, у групи АСРА+RF+ (тзв. серопозитивним) РА била значајно већа заступљеност особа чији су СИС садржали честице од 32,7, 1218 и 1718 nm и мањи број особа чији су СИС у себи имали честице од 396 nm. Занимљиво је да се ове честице нису могле повезати са статистички значајним порастом/променом/ у нивоу било које класе имуноглобулина у СИС особа са РА у односу на контролне СИС [186].

У овом делу истраживања показано је да је могуће одредити дистрибуцију величина честица и мапирати честице које су највише заступљене унутар СИС особа са РА и здравих особа, као и да је могуће показати да постоји значајна разлика у заступљености честица које улазе у састав СИС РА у односу на СИС особа контролне групе. Иако су имуноглобулини главни конституенти имунокомплекса, и иако су познате вредности хидродинамичких пречника молекула имуноглобулина (IgG – 5,29 nm; IgA – 6,50 nm; IgM – 12,6 nm), као и њихових протеолитичких фрагмената (F(ab')<sub>2</sub> – 4,48 nm; Fc – 3,19 nm; Fab – 2,19 nm) [187], у овом моменту не можемо да претпоставимо молекулски састав доминантних колоидних партикула у СИС узорцима особа са РА или здравих особа. Разлог за то је чињеница да се конформација и хидродинамички пречник молекула имуноглобулина мења зависно од састава и рН пуфера у коме се налази, али и као последица интеракције са антигеном [127,166]. Такође, треба имати у виду да хидродинамички пречник агрегираног молекула имуноглобулина (као и било ког другог протеина) није једнак збиру пречника мономера [188].

Иако добијени резултати указују да је фотон корелационом спектроскопијом могуће детектовати промене у величини честица СИС особа са РА у односу на здраве особа и корелисати величину честица са садржајем молекула имуноглобулина, неопходне су обимније студије како би се побољшала поузданост и прецизност одређивања величине честица у саставу СИС и како би добијени подаци могли да се примене као критеријум у дијагнози или праћењу РА. Ове студије би требало да буду праћење напредним биохемијским, физичко-хемијским и имунохемијским методама анализе молекуларног састава СИС и математичког моделовања резултата фотон корелационе спектроскопије у складу са специфичном геометријом молекула имуноглобулина и имунокомплекса у целини.

### **5.2.2.3. Ефекат замрзавања и утицај на величину честица имунокомплекса мерених фотон корелационом спектроскопијом.**

С обзиром да је предмет ове дисертације испитивање могућности коришћења фотон корелационе спектроскопије у дијагностичке сврхе, као посебан сегмент издвојено је и испитивање утицаја замрзавања имунокомплекса на величину честица у њима, имајући у виду да клиничке лабораторије нису опремљене фотон корелационим спектрофотометрима. По правилу, узорци се за специјализована истраживања чувају замрзнути и у таквом облику транспортују у специјализоване лабораторије.

Познато је да замрзавање доводи до сложених физичких и хемијских промена у протеинима који се налазе у раствору. Ове промене укључују стварање нових површина на граници фаза лед/раствор, адсорпцију на површину суда, криоконцентрацију протеина и растворених материја, као и промене рН вредности услед кристализације компоненти пуфера [24]. Главни конституенти имунокомплекса су протеини који су осетљиви на промене температуре, при чему замрзавање може да доведе до њихове денатурације. Денатурирани протеини често имају тенденцију да формирају агрегате, што може

значајно утицати на резултате добијене фотон корелационом спектроскопијом јер се тако региструје повећање величине честица, какво реално не постоји у физиолошким условима [139].

Како до сада нису објављени резултати студија о утицају замрзавања и одмрзавања на величину колоидних честица СИС особа са РА, у овој фази истраживања применом фотон корелационе спектроскопије је анализирана расподела величина честица у 10 СИС особа са РА и 10 СИС здравих особа након замрзавања и чувања на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , у периоду од две године (март 2021. – април 2023).

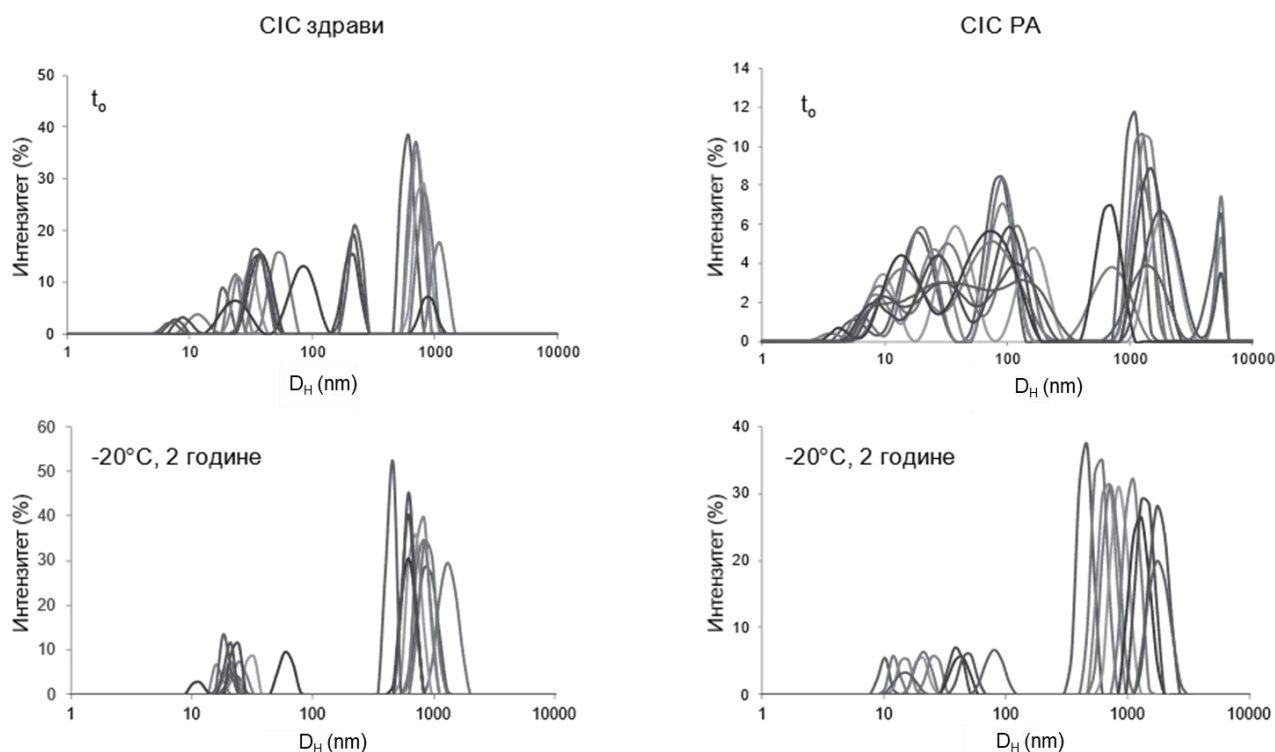
Након одмрзавања су поново измерене вредности  $A_{350}$  за све узорке, и показано је да је су ове вредности у 7 од 10 узорака СИС здравих особа и 5 од 10 узорака СИС особа са РА биле веће у односу на вредности пре замрзавања (табела 5.4).

**Табела 5.4.** Промена вредности  $A_{350}$  СИС здравих особа и СИС особа са РА након две године стајања на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

	СИС здрави $A_{350}$			СИС РА $A_{350}$			
	2021	2023		2021	2023		
<i>CIC 1</i>	0,032	0,057	1,78	<i>CIC 1</i>	0,775	0,64	0,83
<i>CIC 2</i>	0,833	1,415	1,7	<i>CIC 2</i>	0,209	0,315	1,51
<i>CIC 3</i>	0,201	0,171	0,85	<i>CIC 3</i>	0,903	1,16	1,28
<i>CIC 4</i>	0,51	0,56	1,1	<i>CIC 4</i>	0,62	0,5	0,81
<i>CIC 5</i>	0,967	1,196	1,24	<i>CIC 5</i>	0,484	0,444	0,92
<i>CIC 6</i>	0,535	0,477	0,89	<i>CIC 6</i>	0,444	0,12	0,27
<i>CIC 7</i>	0,919	1,163	1,27	<i>CIC 7</i>	0,879	0,781	0,89
<i>CIC 8</i>	1,202	1,217	1,01	<i>CIC 8</i>	0,338	0,345	1,02
<i>CIC 9</i>	0,421	0,12	0,29	<i>CIC 9</i>	0,378	0,114	0,3
<i>CIC 10</i>	0,392	0,676	1,72	<i>CIC 10</i>	0,369	0,411	1,11
$\bar{x}$	<b>0,601</b>	<b>0,705</b>	<b>1,17</b>	$\bar{x}$	<b>0,54</b>	<b>0,483</b>	<b>0,89</b>
SD	0,35	0,484		SD	0,229	0,299	

Фотон корелационом спектроскопијом је детектована промењена дистрибуција величине честица након одмрзавања узорака, при чему се уочава тренд повећања интензитета расуте светлости у правцу честица веће хидродинамичког пречника у обе групе СИС (слика 5.26). Овакав резултат указује да је током замрзавања, чувања и поновног одмрзавања узорака дошло до денатурације и агрегације протеина који улазе у састав СИС, а који су детектовани овом методом.

Ови резултати јасно показују да је за потенцијалну примену фотон корелационе спектроскопије у дијагностичке сврхе неопходно анализирати узорак одмах након њиховог изоловања из серума пацијената. Како је анализа одмах по изоловању СИС у нашој земљи доступна клиникама и болницама у већим градовима, потребно је у будућем раду развијати поступке стабилизације СИС који би омогућили њихову поуздану анализу фотон корелационом спектрометријом и након замрзавања узорка.



**Слика 5.26.** Фотон корелациона спектроскопија: Анализа величине колоидних честица збирним узорцима CIS особа са РА и CIS здравих особа након изоловања ( $t_0$ ) и након две године стајања на  $-20\text{ }^\circ\text{C}$

Резултати су приказани као зависност процента расуте светлости од пречника честица.  $D_H$  (nm): хидродинамички пречник колоидних честица.

### 5.2.3. Поређење резултата анализе величине колоидних CIS честица добијених фотон корелационом спектроскопијом са резултатима добијеним ултрацентрифугирањем на гелу сахарозе, гел филтрацијом и микроскопским методама (SEM и AFM)

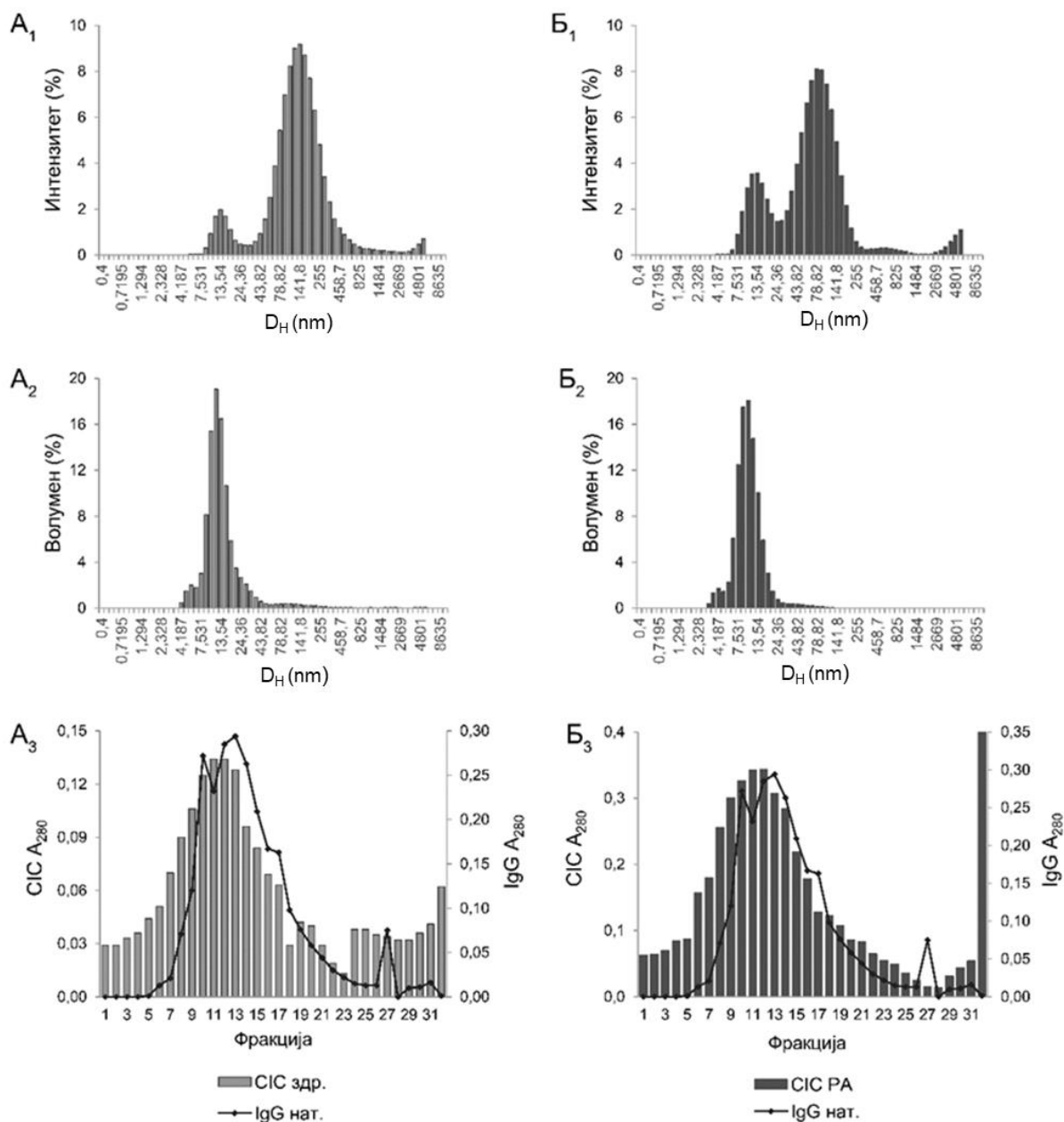
У последњих десетак година публикован је већи број радова у којима су применом напредних метода, пре свега методе течне хроматографије у комбинацији са масеном спектроскопијом [45, 189] и напредних микроскопских метода, добијени веома важни подаци о структури и саставу имунокомплекса [4, 79, 82, 190]. Међутим, примена ових метода у дијагностичке сврхе, с обзиром на цену инструмената, комплексност извођења, потребу за високообученим кадром, као и на време потребно за извођење, се не може очекивати у блиској будућности. Неке мање „захтевне“ методе, као што су ултрацентрифугирање [55] или гел филтрација [144] које се деценијама примењују за анализу величине и састава, такође имају релативно дуго време извођења.

У завршном делу ове докторске дисертације, резултати анализе величине честица које улазе у састав имунокомплекса добијени фотон корелационом спектроскопијом упоређени су са резултатима добијеним ултрацентрифугирањем на градијенту сахарозе, гел филтрацијом, као и са резултатима добијеним микроскопским методама (SEM и AFM), имајући у виду да су то ипак најчешће коришћене методе анализе величине имунокомплекса за потребе научних истраживања, да су данас доступне већини истраживачких лабораторија, и да су на основу резултата ових метода произашла главна сазнања о имунокомплексима.

С обзиром на то да је у претходном делу рада показано да замрзавање утиче на величину честица које улазе у саставу имунокомплекса, а да је било немогуће одмах по завршеној фотон корелационој спектроскопији урадити и ултрацентрифугирање, гел филтрације, SEM и AFM, узорци СИС су замрзавани и непосредно пре наведених анализа су одмрзнути и поново је анализирана величина СИС честица фотон корелационом спектроскопијом. С обзиром на то да је запремина једног узорка СИС била 0,5 mL, и да се гел филтрацијом и ултрацентрифугирањем узорци веома разблажују и не могу се даље користити, није било могуће анализирати један узорак СИС свим наведеним методама, тако да је свака анализа рађена са по два одабрана узорака.

На слици 5.27 показани су резултати упоредне анализе величине честица СИС фотон корелационом спектроскопијом и ултрацентрифугирањем на континуираном градијенту сахарозе распона 10-37%. Фотон корелациона спектроскопија је у СИС здраве особе детектовала присуство две групе честица, чија је средња величина била 13,5 и 141 nm. У СИС здраве особе је такође детектовано присуство две главне групе честица од 13,5 и 78,8 nm, али је било детектован и сигнал слабог интензитета који је потицао од честица величине 458-712 nm (слика 5.27 А<sub>1</sub> и Б<sub>1</sub>). Ипак, честице мањег пречника су у оба анализирана СИС биле главна компонента узорка (слика 5.27 А<sub>2</sub> и Б<sub>2</sub>). Након фракционисања ултрацентрифугирањем и за СИС здраве особе и за СИС особе са РА детектована је широка дистрибуција конституената, а највећа вредности А<sub>280</sub>, тј. највећа количина протеина у оба узорка СИС је детектована у фракцијама 10-13, што је одговарало и максималној А<sub>280</sub> и нативних молекула IgG раздвојених ултрацентрифугирањем. Овакво позиционирање максималне количине протеина рефлектује реверзибилну природу СИС која чини основу њихове нестабилности под утицајем јаке центрифугалне силе. Количина протеина детектована у фракцији 32 (талогу), је била већа у СИС особе са РА него у контролном СИС, што би могло да укаже да је анализирани узорак СИС особе са РА садржао више стабилних агрегата од контролног СИС (слика 5.27 А<sub>3</sub> и Б<sub>3</sub>).

Ултрацентрифугирање се, барем у овим експерименталним условима, показало мање „прецизним“ од фотон корелационе спектроскопије. Ово, заједно са трајањем поступка ултрацентрифугирања од најмање два дана (припрема градијента, центрифугирање, анализа фракција), чини ову методу мање прикладном од фотон корелационе спектроскопије за дијагностичко одређивање величине колоидних честица у саставу имунокомплекса.

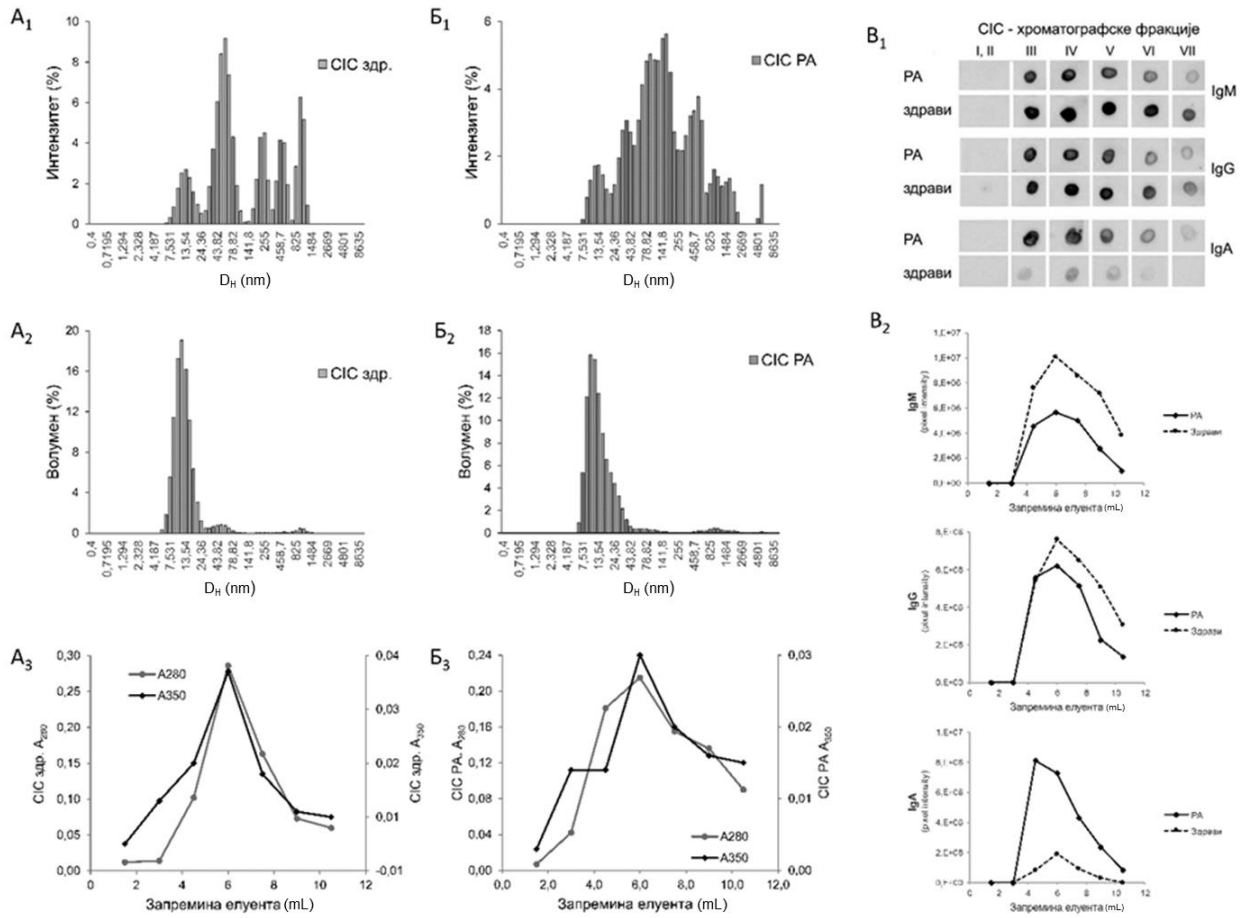


**Слика 5.27.** Анализа величине колоидних честица СИС здраве особе (А) и особе са РА (Б) фотон корелционом спектроскопијом и ултрацентрифугирањем на градијенту сахарозе

Резултати су фотон корелционе спектроскопије су приказани као средња вредност 10 мерења зависности процента расуте светлости од пречника честица (А<sub>1</sub> и Б<sub>1</sub>) и као средња вредност 10 мерења зависност запреминског удела честица од пречника (А<sub>2</sub> и Б<sub>2</sub>). D (nm): хидродинамички пречник колоидних честица. А<sub>3</sub> и Б<sub>3</sub>: Фракционисање СИС здраве особе и особе са РА на 10-37% континуираном градијенту сахарозе.

На слици 5.28 приказани су резултати упоредне анализе величине честица СИС фотон корелационом спектроскопијом и гел филтрацијом на *Sephacryl S-300* матриксу. Фотон корелационом спектроскопијом је у оба узорка детектован већи број честица који су у СИС здраве особе били груписани у пет издвојених врхова, а у СИС особе са РА у пет делимично суперпонираних врхова (слика 5.28 А<sub>1</sub> и Б<sub>1</sub>). Ипак, честице пречника 10-11

pm су у оба анализирана СИС биле главна компонента узорка (слика 5.28 А<sub>2</sub> и Б<sub>2</sub>). Гел филтрација ових узорака је показала да иако је елуција протеина СИС здраве особе била оштрија и, за разлику од СИС особе са РА, није се могла јасно уочити елуција агрегата у првим фазама хроматографије (праћена на основу А<sub>280</sub> и А<sub>350</sub>), ипак је главни део протеинског садржаја оба анализирана СИС детектован у 4. фракцији (одговара елуенту запремине 6 mL). То значи да је молекулска маса оба узорка била мања од молекулске тежине маркера гел филтрације, плавог декстрана тежине 1000 kDa, који је детектован у другој фракцији (одговара елуенту запремине 6 mL) (слика 3.12). Дот блот анализом показана је различита дистрибуција класа имуноглобулина у СИС здраве особе и СИС особе са РА након фракционисања ових СИС гел филтрацијом (слика 5.28 В). Из тог разлога гел филтрација би могла да се примењује, ако би се показало да је то дијагностички потребно, након анализе фотон корелационом спектроскопијом која не мења структуру узорка СИС.

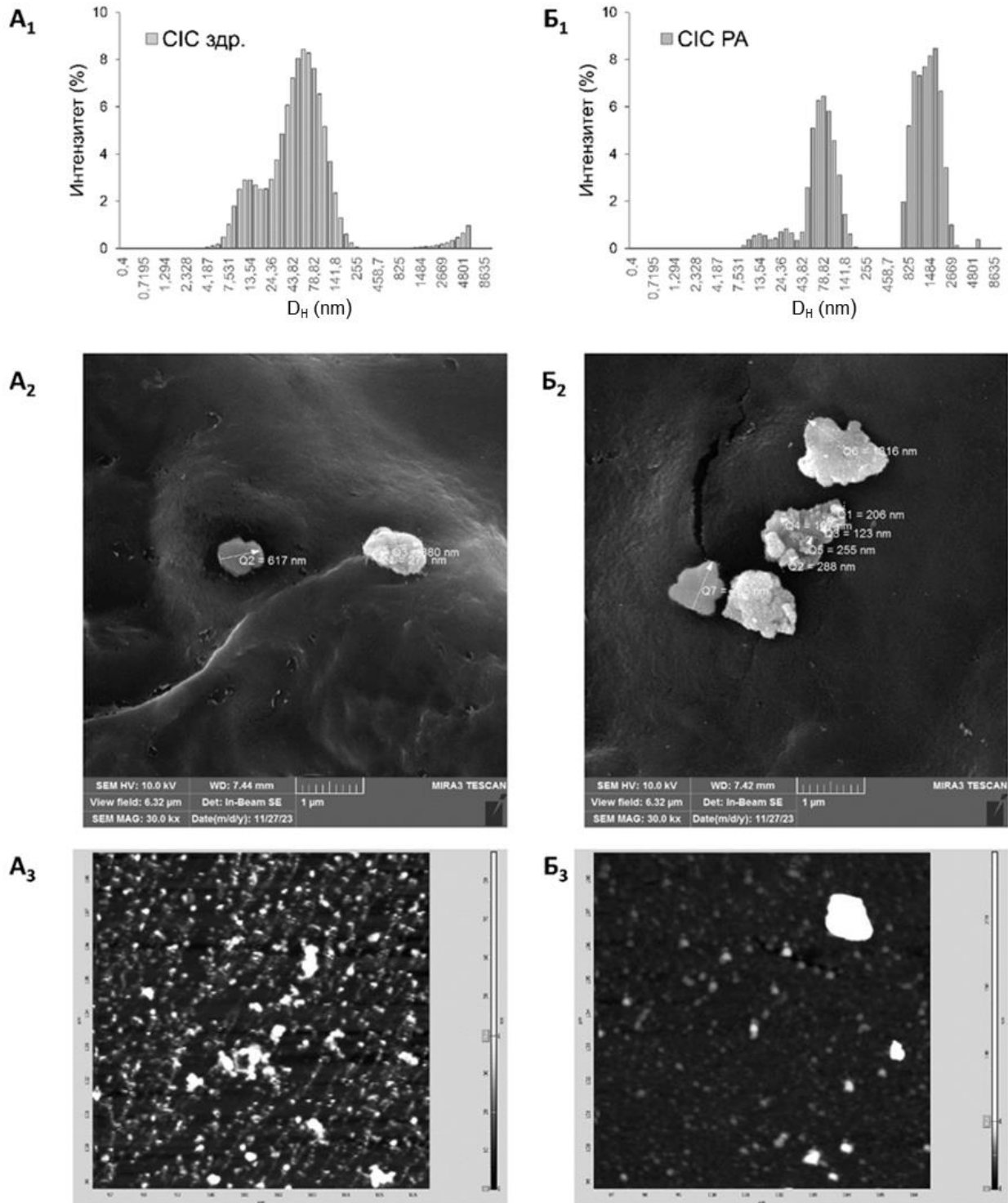


**Слика 5.28.** Анализа величине колоидних честица СИС здраве особе (А) и особе са РА (Б) фотон корелационом спектроскопијом и гел филтрацијом на *Sephacryl S-300* матриксу.

Резултати су фотон корелционе спектроскопије су приказани као средња вредност 10 мерења зависности процента расуте светлости од пречника честица (А<sub>1</sub> и Б<sub>1</sub>) и као средња вредност 10 мерења зависност запреминског удела честица од пречника (А<sub>2</sub> и Б<sub>2</sub>).  $D_H$  (nm): хидродинамички пречник колоидних честица. А<sub>3</sub> и Б<sub>3</sub>: Фракционисање СИС здраве особе и особе са РА гел филтрацијом на *Sephacryl S-300* матриксу. В: Дот блот анализа IgM, IgG и IgA фракција СИС добијеним раздвајањем на *Sephacryl S-300* матриксу. В<sub>1</sub> – дот блот; В<sub>2</sub> – садржај IgM, IgG и IgA одређен дензитометријском анализом.

За упоредну анализу расподеле величина СИС честица добијене фотон корелационом спектроскопијом и микроскопским методама (SEM и AFM) коришћен је узорак СИС здраве особе у коме су детектоване две групе честица средње величине 13,5 и 58,8 nm (слика 5.29 А<sub>1</sub>) и узорак СИС особе са РА у коме су детектоване две главне групе честица средњег пречника од 78,8 и 955-1718 nm, и честице од 13,5 и 28,2 nm (слика 5.29 Б<sub>1</sub>). FE-SEM је показала разлику како у морфологији, тако и у величини честица које улазе у састав СИС контролне групе и СИС РА групе, при чему се у СИС особе са РА уочавао већи број честица различитих величина, у односу на СИС контролну групу (слика 5.29 А<sub>2</sub> и Б<sub>2</sub>). За разлику од FE-SEM анализе, AFM метода је показала присуство већег број честица које улазе у састав СИС контролне групе (слика 5.29 А<sub>3</sub>) у односу на СИС РА (слика 5.29 Б<sub>3</sub>). Такође се може приметити да су честице у СИС контролне групе равномерно распоређене, док у СИС РА та дистрибуција није уједначена као ни величина честица.

На основу ових резултата анализе величина СИС честица микроскопским методама у поређењу са резултатима добијеним фотон корелационом спектроскопијом може се закључити то, да обе микроскопске анализе детектују величине честица које превазилазе величину доминантних честица детектовану фотон корелационом спектроскопијом (највећу запремину заузимају честице мањих величина), а чак и физиолошку величину имунокомплекса која се креће у опсегу 100-1000 nm [89]. Ово је последица денатурације и агрегације протеина током поступка обраде узорка за микроскопску анализу, и на микрографијама се уочава „слепљивања“ градивних елемената у структуре које не постоје у физиолошким условима. Према подацима из литературе, применом различитих типова електронске микроскопије могуће уочити „У“ структуру појединачних молекула имуноглобулина и структуру агрегата у којој је јасно могуће разликовати појединачне молекуле имуноглобулина [191-196]. Међутим, у нашим експерименталним условима то није било могуће.



**Слика 5.29.** Анализа величине честица CIC здраве особе (А) и особе са РА (Б) фотон корелационом спектроскопијом, и микроскопским методама (SEM и AFM)  
 А<sub>1</sub> и Б<sub>1</sub>: Резултати фотон корелационе спектроскопије приказани су као средња вредност 10 мерења зависности процента расуте светлости од пречника честица.  $D_H$  (nm): хидродинамички пречник колоидних честица. А<sub>2</sub> и Б<sub>2</sub>: FE-SEM; А<sub>3</sub> и Б<sub>3</sub>: AFM.



## 6. ЗАКЉУЧЦИ

У овој докторској дисертацији испитана је претпоставка да је применом фотон корелационе спектроскопије могуће одредити величину колоидних честица у имунокомплексима формираним у физиолошким и патолошким стањима људи.

На основу приказаних резултата могу се извести следећи закључци:

- Фотон корелационом спектроскопијом могуће је детектовати промену величине колоидних честица у агрегираним IgG у односу на нативне IgG. Промену величине могуће је детектовати и ултрацентрифугирањем, гел филтрацијом, микроскопским методама (AFM и SEM), али резултате добијене применом различитих метода није могуће директно упоредити.
- Фотон корелационом спектроскопијом могуће је детектовати динамичке промене величине колоидних честица у *in vitro* формираним имунокомплексима које настају као последица промене односа антигена и антитела.
- Циркулишући имунокомплекси здравих особа и особа са реуматоидним артритисом се могу изоловати преципитацијом полиетилен гликолом, а величина колоидних честица у изолованим циркулишућим имунокомплексима се може одредити/проценити фотон корелационом спектроскопијом.
- Мерењем величине колоидних честица циркулишућих имунокомплекса здравих особа и особа са РА фотон корелационом спектроскопијом могуће је формирати референтни систем дистрибуције величине честица које улазе у састав циркулишућих имунокомплекса у физиолошким условима и код реуматоидног артритиса. И у циркулишућим имунокомплексима контролне групе и у циркулишућим имунокомплексима особа са реуматоидним артритисом детектује се 50 честица различитог пречника, које се највећим делом групишу у два скупа: први са честицама од 7,5 nm до 164 nm и други са честицама од 342 nm до 1718 nm. У циркулишућим имунокомплексима особа са РА детектује се већи број честица од 28,2, 531, 712 и 1718 nm, и мањи број честица а од 78,8 nm, у односу на контролу.
- Промене у нивоима имуноглобулина у циркулишућим имунокомплексима особа са РА се не подударају са обрасцем расподеле величина честица детектованим фотон корелационом спектроскопијом. Повећан ниво IgA у циркулишућим имунокомплексима особа са реуматоидним артритисом, у односу на контролну групу повезан је са појавом код више од 50% детектованих честица различитих величина. При томе је значајно повишен ниво укупних IgG у циркулишућим имунокомплексима особа са реуматоидним артритисом повезан са оним циркулишућим имунокомплексима који садрже честице пречника 7,5, 18,2, 21,0, 24,0, 220, 396, 712, и 812 nm. Повећан ниво IgM је детектован у циркулишућим имунокомплексима који садрже честице пречника 32,7, 43,8, 220, 396, 531 и 1281 nm. Истовремено повећање нивоа све три класе имуноглобулина у циркулишућим имунокомплексима особа са реуматоидним артритисом, у поређењу са циркулишућим имунокомплексима здравих особа, показано је само у циркулишућим имунокомплексима који истовремено садрже честице од 220 и 396 nm.
- Резултати анализе величине честица у саставу циркулишућих имунокомплекса добијени фотон корелационом спектроскопијом, ултрацентрифугирањем, гел

филтрацијом и микроскопским методама (AFM и SEM) се не могу директно упоредити. Међутим, фотон корелациона спектроскопија превазилази ограничења других метода, пре свега дуго време извођења анализе, денатурацију и разблаживање узорка.

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације показала су да је применом фотон корелационе спектроскопије могуће проценити величину колоидних честица у имунокомплексима формираним у физиолошким и патолошким стањима. За поуздану примену у клиничкој дијагностици потребно је спровести студије већег обима како би се, уз примену машинског учења, направио поуздан модел који дефинише величине честица карактеристичне за одређене болести. Ови подаци би се затим могли користити за дијагнозу, праћење прогресије болести и тестирање ефикасности различитих терапијских протокола, укључујући класичне лекове и биотерапеутике.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Falke, Sven, and Christian Betzel. Dynamic Light Scattering (DLS). Radiation in Bioanalysis. Springer, Cham, 2019. 173-193.
2. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. Biophysical reviews. 2016, 8:409-427.
3. Murphy RM, Slayter H, Schurtenberger P, Chamberlin RA, Colton CK, Yarmush ML. Size and structure of antigen-antibody complexes. Electron microscopy and light scattering studies. Biophysical journal. 1988, 54(1):45-56.
4. György B, Módos K, Pállinger E, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgár A, Tóth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzás EI. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. Blood. 2011, 117(4):e39-48.
5. Hexley P, Robinson CT, Osterburg AR, Babcock GF. Circulating microparticles do not all share biophysical light scatter properties with immune complexes when analyzed by flow cytometry. Blood. 2012, 120:1528-1529.
6. Stieh DJ, King DF, Klein K, Liu P, Shen X, Hwang KK, Ferrari G, Montefiori DC, Haynes B, Pitisuttithum P, Kaewkungwal J, Nitayaphan S, Rerks-Ngarm S, Michael NL, Robb ML, Kim JH, Denny TN, Tomaras GD, Shattock RJ. Aggregate complexes of HIV-1 induced by multimeric antibodies. Retrovirology. 2014, 11:78.
7. Hörl G, Froehlich H, Ferstl U, Ledinski G, Binder J, Cvirn G, Stojakovic T, Trauner M, Koidl C, Tafeit E, Amrein K, Scharnagl H, Jürgens G, Hallström S. Simvastatin Efficiently Lowers Small LDL-IgG Immune Complex Levels: A Therapeutic Quality beyond the Lipid-Lowering Effect. PLoS One. 2016, 11(2):e0148210.
8. Starshinova A, Zinchenko Y, Filatov M, Denisova N, Istomina E, Landa S, Burdakov V, Churilov L, Sapozhnikova N, Pavlova M, Stepanenko T, Mayevskaya V, Yablonskiy P. Specific features of immune complexes in patients with sarcoidosis and pulmonary tuberculosis. Immunol Res. 2018, 66(6):737-743.
9. Landa SB, Korabliov PV, Semenova EV, Filatov MV. Peculiarities of the formation and subsequent removal of the circulating immune complexes from the bloodstream during the process of digestion. F1000Research. 2018, 7:123.
10. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology (6th edition), Saunders, Elsevier Comp, Philadelphia, PA. 2007.
11. Nezlin R. Circulating non-immune IgG complexes in health and disease. Immunol Lett. 2009, 122(2):41-4.
12. Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Detection of immune complexes: techniques and implications. Hosp Pract. 1980a, 15(5):107-11, 114-7, 121.
13. Berzofsky JA, Berkover IJ. Antigen-antibody interactions and monoclonal antibodies. In: Paul WE (ed) Fundamental Immunology, Lippincott Williams & Wilkins, 2013, 183-214.
14. Rojko JL, Evans MG, Price SA, Han B, Waine G, DeWitte M, Haynes J, Freimark B, Martin P, Raymond JT, Evering W, Rebelatto MC, Schenck E, Horvath C. Formation, clearance, deposition, pathogenicity, and identification of biopharmaceutical-related immune complexes: review and case studies. Toxicol Pathol. 2014, 42(4):725-764.
15. McCluskey RT, Hall CL, Colvin RB. Immune complex mediated diseases. Human Pathology. 1978, 71-84.
16. Chang MH, Nigrovic PA. Antibody-dependent and -independent mechanisms of inflammatory arthritis. JCI Insight. 2019, 4:123.
17. Maibom-Thomsen SL, Trier NH, Holm BE, Hansen KB, Rasmussen MI, Chailyan A, Marcatili P, Højrup P, Houen G. Immunoglobulin G structure and rheumatoid factor epitopes. PLoS One. 2019, e0217624.

18. Dayer E, Gerster JC, Aguado MT, Lambert PH. Capacity to solubilize immune complexes in sera and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1983, 26(2):156-64.
19. Goulet DR, Atkins WM. Considerations for the design of antibody-based therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020, 109(1):74-103.
20. Virella G, Kilpatrick JM, Chenais F, Fudenberg HH. Isolation of soluble immune complexes from human serum: combined use of polyethylene glycoprecipitation, gel filtration, and affinity chromatography on protein A-Sepharose. *Methods. Enzymol.* 1981, 74:644-63.
21. Jones VE, Orlans E. Isolation of immune complexes and characterisation of their constituent antigens and antibodies in some human diseases: a review. *J Immunol Methods*. 1981, 44: 249-270.
22. Easterbrook-Smith SB. A light-scattering method for measuring the sizes of insoluble immune complexes. *Mol Immunol*. 1993, 30:637-40.
23. Khlebtsov BN, Burygin GL, Matora LY, Shchyogolev SY, Khlebtsov NG. A method for studying insoluble immune complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1670:199-207.
24. Mahler HC, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009, 98(9):2909-2934.
25. den Engelsman J, Garidel P, Smulders R, Koll H, Smith B, Bassarab S, Seidl A, Hainzl O, Jiskoot W. Strategies for the assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development. *Pharm Res*. 2011, 28(4):920-33.
26. den Engelsman J, Kebbel F, Garidel P. Laser Light Scattering-Based Techniques Used for the Characterization of Protein (Chapter 3). In: Mahler H-C, Jiskoot W (Eds). *Analysis of aggregates and particles in protein pharmaceuticals*. Jon Wiley & Sons, Inc. 2012, 37.
27. Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, Kimber I. Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J Immunotoxicology*. 2014, 11(2):99-109.
28. Nezlin R. *The Immunoglobulins: Structure and Function*. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press. 1998, 269.
29. Vaillant AAJ, Jamal Z, Patel P, Ramphul K. Immunoglobulin. In: *StatPearls*. 2023.
30. Schroeder HW, Cavacini L. *Structure and Function of Immunoglobulins*. *Allergy Clin Immunol*. 2010, 125: 41-52.
31. Jefferis R, Pound J, Lund J, Goodall M. Effector mechanisms activated by human IgG subclass antibodies: clinical and molecular aspects. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1994, 52:57- 65.
32. Michaelsen TE, Natvig JB. The hinge region of IgG3, an extended part of the molecule. *FEBS Lett*. 1972, 28(1):121-4.
33. Reinholdt, Jesper, and S. Husby. "IgA and mucosal homostasis." *Oral Tolerance: The Response of the Intestinal Mucosa to Dietary Antigens*. Eureka.com and Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. 81-112.
34. De Sousa-Pereira P, Woof JM. IgA: structure, function, and developability. *Antibodies*. 2019, 8(4):57.
35. Putnam FW, Liu YS, Low TL. Primary structure of a human IgA1 immunoglobulin. IV. Streptococcal IgA1 protease, digestion, Fab and Fc fragments, and the complete amino acid sequence of the alpha 1 heavy chain. *J Biol Chem*. 1979, 254(8):2865-74.
36. Sathe A, Cusick JK. *Biochemistry, immunoglobulin M*. 2020.
37. Nydegger UE. Immune Complexes: In: Delves Pj (Ed) *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*. 1998, 1220-1225.
38. Wang TT, Ravetch JV. Immune complexes: not just an innocent bystander in chronic viral infection. *Immunity*. 2015, 42:213-215.
39. Wang XY, Wang B, Wen YM. From therapeutic antibodies to immune complex vaccines. *NPJ Vaccines*. 2019, 4:2.
40. Wen YM, Mu L, Shi Y. Immunoregulatory functions of immune complexes in vaccine and therapy. *EMBO Molec Med*. 2016, 8(10):1120-1133.

41. Muso E, Sekita K, Doi T, Kuwahara T, Yoshida H, Tamura T, Kawai C, Hamashima Y. Immunopathological correlation between mesangial C3d-deposition and C3d-fixing circulating immune complexes in lupus nephritis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1984, 32(3):351-8.
42. Herberman RB, McIntire KR, editors. *Immunodiagnosis of cancer.* 1979, 9.
43. Barnett EV. Circulating immune complexes: their biologic and clinical significance. *J Allergy Clin Immunol.* 1986, 78(6):1089-96.
44. Lawley TJ, Hall RP. Circulating immune complexes in dermatologic disease. *Springer Semin Immunopathol.* 1981, 4:1-17.
45. Aibara N, Ohyama K. Revisiting immune complexes: Key to understanding immune-related diseases. *Adv Clin Chem.* 2020, 96:1-17.
46. Национални водич добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење реуматоидног артритиса, Министарство здравља, Република Србија, Клинички водич 26/13, Београд, 2013.
47. Zlatković-Švenda MI, Stojanović RM, Šipetić-Grujičić B, Guillemin F. Prevalence of rheumatoid arthritis in Serbia. *Rheumatology International.* 2014, 34:649-58.
48. Pope JE, Movahedi M, Rampakakis E. Correction: ACPA and RF as predictors of sustained clinical remission in patients with rheumatoid arthritis: Data from the Ontario Best Practices Research Initiative (OBRI). *RMD Open.* 2019, 5.
49. Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Res Ther.* 2015, 17:229.
50. Miriovsky BJ, Michaud K, Thiele GM, O'Dell JR, Cannon GW, Kerr G, Richards JS, Johnson D, Caplan L, Reimold A, et al. Anti-CCP antibody and rheumatoid factor concentrations predict greater disease activity in men with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010, 69:1292-7.
51. Möttönen T, Paimela L, Leirisalo-Repo M, Kautiainen H, Ilonen J, Hannonen P. Only high disease activity and positive rheumatoid factor indicate poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis treated with "sawtooth" strategy. *Ann Rheum Dis.* 1998, 57:533-9.
52. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes REM, Huizinga TW. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005, 7
53. Zoto A, Selimi B. The relationship of rheumatoid factor with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Sci Res.* 2013, 4:2319-7064.
54. Rönnelid J, Wick MC, Lampa J, Lindblad S, Nordmark B, Klareskog L, Van Vollenhoven RF. Longitudinal analysis of citrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5-year follow-up in early rheumatoid arthritis: anti-CP status predicts worse disease activity and greater radiological progression. *Ann Rheum Dis.* 2005, 64:1744-9.
55. Mageed RA, Kirwan JR, Thompson PW, McCarthy DA, Holborow EJ. Characterisation of the size and composition of circulating immune complexes in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1991, 50:231-6.
56. Sohrabian A, Mathsson-Alm L, Hansson M, Knight A, Lysholm J, Cornillet M, Skriner K, Serre G, Larsson A, Weitoft T, et al. Number of individual ACPA reactivities in synovial fluid immune complexes, but not serum anti-CCP2 levels, associate with inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2018, 77:1345-53.
57. Luthra HS, McDuffie FC, Hunder GG, Samayoa EA. Immune complexes in sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. Radioimmunoassay with monoclonal rheumatoid factor. *J Clin Investig.* 1975, 56:458-66.
58. Zubler RH, Nydegger U, Perrin LH, Fehr K, McCormick J, Lambert PH, Miescher PA. Circulating and intra-articular immune complexes in patients with rheumatoid arthritis.

- Correlation of 125I-C1q binding activity with clinical and biological features of the disease. *J Clin Investig.* 1976, 57:1308-19.
59. Reeback JS, Silman AJ, Holborow EJ, Maini RN, Hay FC. Circulating immune complexes and rheumatoid arthritis: A comparison of different assay methods and their early predictive value for disease activity and outcome. *Ann Rheum Dis.* 1985, 44:79-82.
  60. Antes U, Heinz HP, Schultz D, Brackertz D, Loos M. C1q-bearing immune complexes detected by a monoclonal antibody to human C1q in rheumatoid arthritis sera and synovial fluids. *Rheumatol Int.* 1991, 10:245-50.
  61. Michelin MA, Crott LSP, Assis-Pandochi AI, Coimbra TM, Teixeira JE, Barbosa JE. Influence of the electric charge of the antigen and the immune complex (IC) lattice on the IC activation of human complement. *Int J Exp Pathol.* 2002, 83:105-10.
  62. Ohyama K, Ueki Y, Kawakami A, Kishikawa N, Tamai M, Osaki M, Kuroda N. Immune complexome analysis of serum and its application in screening for immune complex antigens in rheumatoid arthritis. *Clin Chem.* 2011, 57:905-9.
  63. Roberts-Thomson PJ, Hazleman BL, Barnett IG, MacLennan IC, Mowat AG. Factors relating to circulating immune complexes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1976, 35(4):314-20.
  64. Jans H, Halberg P, Lorenzen I. Circulating immune complexes in rheumatoid arthritis with extra-articular manifestations. *Scand J Rheumatol.* 1983, 12(3):215-8.
  65. Zhao X, Okeke NL, Sharpe O, Batliwalla FM, Lee AT, Ho PP, Tomooka BH, Gregersen PK, Robinson WH. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008, 10:1-13.
  66. Meretey K, Falus A, Erhardt CC, Maini RN. IgE and IgE-rheumatoid factors in circulating immune complexes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1982, 41(4):405-8.
  67. Negishi-Koga T, Gober HJ, Sumiya E, Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Suematsu A, Suda T, Sato K, Takai T, et al. Immune complexes regulate bone metabolism through FcR $\gamma$  signalling. *Nat Commun.* 2015, 6:6816.
  68. Breedveld AC, van Gool MMJ, van Delft MAM, van der Laken CJ, de Vries TJ, Jansen IDC, van Egmond M. IgA immune complexes induce osteoclast-mediated bone resorption. *Front Immunol.* 2021, 12:738871.
  69. Gimpel AK, Maccataio A, Unterweger H, Sokolova MV, Schett G, Steffen U. IgA complexes induce neutrophil extracellular trap formation more potently than IgG complexes. *Front Immunol.* 2022, 12:796305.
  70. Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Immune complexes in human diseases: A review. *Am J Pathol.* 1980b, 100(2):529-54.
  71. Hebert LA. The clearance of immune complexes from the circulation of man and other primates. *Am J Kidney Dis.* 1991, 17(3): 352-361.
  72. Brakke MK. Density gradient centrifugation and its application to plant viruses. In *Advances in Virus Research.* 1961, 7:193-224.
  73. Vujčić Zoran. Eksperimentalna biohemija: praktikum. Rantec, 2002.
  74. Elsayed YY, Kühl T, Imhof D. Edman degradation reveals unequivocal analysis of the disulfide connectivity in peptides and proteins. *Anal Chem.* 2024, 96(10):4057-66.
  75. Mahler HC, Jiskoot W, editors. *Analysis of aggregates and particles in protein pharmaceuticals.* John Wiley & Sons; 2011.
  76. Trache A, Meininger GA. Atomic force microscopy (AFM). *Current protocols in microbiology.* 2008, 8(1), 2C-2.
  77. Johnson D, Oatley-Radcliffe DL, Hilal N. Atomic force microscopy (AFM). In: *Membrane characterization.* 2017, p. 115-44.
  78. Guo D, Xie G, Luo J. Mechanical properties of nanoparticles: Basics and applications. *J Phys D Appl Phys.* 2013, 47(1):015305.

79. Hu J, Gao M, Wang Z, Chen Y, Song Z, Xu H. Direct imaging of antigen–antibody binding by atomic force microscopy. *Appl Nanosci.* 2021, 11:293-300.
80. San Paulo A, García R. High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: Attractive and repulsive tip-sample interaction regimes. *Biophys J.* 2000, 78(3):1599-1605.
81. Ierardi V, Ferrera F, Millo E, Damonte G, Filaci G, Valbusa U. Bioactive surfaces for antibody-antigen complex detection by atomic force microscopy. *J Phys Conf Ser.* 2013, 439(1):012001. IOP Publishing.
82. Taatjes DJ, et al. Visualization of macro-immune complexes in the antiphospholipid syndrome by multi-modal microscopy imaging. *Micron.* 2017, 100:23-29.
83. Fischer K, Schmidt M. Pitfalls and novel applications of particle sizing by dynamic light scattering. *Biomaterials.* 2016, 98:79-91.
84. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of controlled release.* 2016, 235:337-351.
85. Zhou W, Apkarian R, Wang ZL, Joy D. Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). In: *Scanning microscopy for nanotechnology: Techniques and applications.* 2007, p. 1-40.
86. Jao W, Horn T. Scanning electron microscopy of immune complexes in membranous glomerulopathy. *Am J Kidney Dis.* 1986, 7(1):35-40.
87. Deverill I, Lock RJ. Kinetics of the antigen:antibody reaction. Light scattering and particle size measurement using photon correlation spectroscopy. *Ann Clin Biochem.* 1983, 20(Pt 4): 224 226.
88. Kovačić M, Fratrić N, Arsić A, Mojsilović S, Drvenica I, Marković D, Maslovarić I, Grujić Milanović J, Ivanov M, Ilić V. Structural characteristics of circulating immune complexes in calves with bronchopneumonia: Impact on the quiescent leukocytes. *Res Vet Sci.* 2020, 133:63-74.
89. Williams JC, Mackman N. MPs or ICs? *Blood.* 2011, 117:1101–1102.
90. Wishard A, Gibb BC. Dynamic light scattering – an all-purpose guide for the supramolecular chemist. *Supramol Chem.* 2019, 31(9):608-615.
91. Rademeyer P, Carugo D, Lee JY, Stride E. Microfluidic system for high throughput characterisation of echogenic particles. *Lab Chip.* 2015, 15:417-428.
92. Fan W, Zheng DJ Singh, Light scattering and surface plasmons on small spherical particles, *Light Sci. Appl.* 2014, e179.
93. Chaturvedi S, Maheshwari D, Chawathe A, Sharma N. Current analytical approaches for characterizing nanoparticle sizes in pharmaceutical research. *J Nanopart Res.* 2024, 26(1):19.
94. Protein interactions investigated with dynamic light scattering. 2009. Webinar on <http://www.malvern.com>. Поцећено: 29.06.2024.
95. <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=11173> Поцећено: 17.06.2024.
96. International Standard on Dynamic Light Scattering ISO 13321. 1996.
97. Mailer AG, Clegg PS, Pusey PN. Particle sizing by dynamic light scattering: non-linear cumulant analysis. *J Phys Condens Matter.* 2015, 27(14):145102.
98. Scotti AE, Liu W, Hyatt JS, Herman ES, Choi HS, Kim JW, ... & Fernandez-Nieves A. The CONTIN algorithm and its application to determine the size distribution of microgel suspensions. *J Chem Phys.* 2015, 142(23).
99. <https://lsinstruments.ch/en/theory/dynamic-light-scattering-dls/dls-data-analysis-the-corenn-method> Поцећено: 17.06.2024.
100. Jaenicke R. Folding and association of proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 1987, 49:117–237
101. Georgieva D, Koker M, Redecke L, Perbandt M, Clos J, Bredehorst R, Genov N, Betzel C. Oligomerization of the proteolytic products is an intrinsic property of prion proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, 323:1278–1286.

102. Redecke L, Binder S, Elmallah MIY, Broadbent R, Tilkorn C, Schulz B, May P, Goos A, Eich A, Rübhausen M, Betzel C. UV-light-induced conversion.2009.
103. Eberstein, Wolfram, Yannis Georgalis, and Wolfram Saenger.Molecular interactions in crystallizing lysozyme solutions studied by photon correlation spectroscopy. Journal of crystal growth.1994, 71-78.
104. Meyer A, Dierks K, Hilterhaus D, Klupsch T, Mühlig P, Kleesiek J, Schöpflin R, Einspahr H, Hilgenfeld R, Betzel C. Single-drop optimization of protein crystallization. Acta Crystallogr Sect F: Struct Biol Cryst Commun. 2012, 68:994–998.
105. Oberthuer D, Melero-García E, Dierks K, Meyer A, Betzel C, Garcia-Caballero A, Gavira JA. Monitoring and scoring counter-diffusion protein crystallization experiments in capillaries by in situ dynamic light scattering. PLoS ONE.2012, 7:e33545.
106. Schubert R, Meyer A, Baitan D, Dierks K, Perbandt M, Betzel C. Real-time observation of protein dense liquid cluster evolution during nucleation in protein crystallization. Cryst Growth Des.2017, 17:954–958.
107. Loske AM, Tello EM, Vargas S, Rodriguez R. Escherichia coli viability determination using dynamic light scattering: a comparison with standard methods. Arch Microbiol. 2014, 196:557–563.
108. Petrache AI, Machin DC, Williamson DJ, Webb ME, Beales PA, Sortase-mediated labelling of lipid nanodiscs for cellular tracing. Mol BioSyst. 2016, 12:1760–1763.
109. Fávero-Retto MP, Palmieri LC, Souza TACB, Almeida FCL, Lima LMTR. Structural meta analysis of regular human insulin in pharmaceutical formulations. Eur J Pharm Biopharm. 2013, 85: 1112–1121.
110. Sontum PC, Christiansen C. Photon correlation spectroscopy applied to characterisation of denaturation and thermal stability of human albumin. J Pharm Biomed Anal. 1997, 15(2):295-302.
111. Bhirde A, Chikkaveeraiah BV, Venna R, Carley R, Brorson K, Agarabi C. High Performance Size Exclusion Chromatography and High-Throughput Dynamic Light Scattering as Orthogonal Methods to Screen for Aggregation and Stability of Monoclonal Antibody Drug Products. J Pharm Sci. 2020, 109(11):3330-3339.
112. Komatsu H, Kitajima A, Okada S. Pharmaceutical characterization of commercially available intravenous fat emulsions: estimation of average particle size, size distribution and surface potential using photon correlation spectroscopy. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1995.
113. Some D, High-Throughput Screening of Biotherapeutics for Developability and Preformulation with Dynamic Light Scattering, The Column 2017, 13(9):22–27.
114. Aboofazeli R, Barlow DJ, Lawrence MJ. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions I. Total intensity light scattering. AAPS PharmSci, 2000.
115. Benita S, Levy MY. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. J Pharm Sci. 1993, 82(9):1069-1079.
116. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. Adv Drug Deliv Rev. 2001, 25;47(2-3):165-96.
117. Demidova MG, Bulavchenko AI, Antonova OV, et al. Photon correlation spectroscopy and the luminescence of stabilized silver nanoparticles in heptane. Russ J Phys Chem. 2015, 89:674-679.
118. Thode K, Müller RH, Kresse M. Two-time window and multiangle photon correlation spectroscopy size and zeta potential analysis--highly sensitive rapid assay for dispersion stability. J Pharm Sci. 2000.
119. Velichko E, Makarov S, Nepomnyashchaya E, Dong G. Molecular aggregation in immune system activation studied by dynamic light scattering. Biology. 2020, 9(6).



120. Pavlović NV, Jovanović JR, Đorđević VB, Balanč BD, Bugarski BM, Knežević Jugović ZD. Priprema i karakterizacija lipozoma sa inkapsuliranim bioaktivnim hidrolizatom proteina soje. *Chem Ind/Hem Industrija*. 2020, 74(5).
121. Edwards KA, Baeumner AJ. Analysis of liposomes. *Talanta*. 2006, 68(5):1432-1441.
122. Lin T, Zhao P, Jiang Y, Tang Y, Jin H, Pan Z, He H, Yang VC, Huang Y. Blood-Brain-Barrier Penetrating Albumin Nanoparticles for Biomimetic Drug Delivery via Albumin-Binding Protein Pathways for Antiglioma Therapy. *ACS Nano*. 2016,10(11):9999-10012.
123. Kossovsky N, Liao K, Gelman A, Campbell P, Amstutz H, Finerman G, Nasser S, Thomas B. Photon correlation spectroscopy analysis of the submicrometre particulate fraction in human synovial tissues recovered at arthroplasty or revision. In: St. KJ, editor. *Particulate debris from medical implants: mechanisms of formation and biological consequences*. West Conshohocken, PA: ASTM International; 1992. p. 68-74.
124. Bertini S, Fareed J, Madaschi L, Risi G, Torri G, Naggi A. Characterization of PF4-Heparin Complexes by Photon Correlation Spectroscopy and Zeta Potential. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2017.
125. Nepomnyashchaya E, Velichko E, Bogomaz T. Diagnostic possibilities of dynamic light scattering technique. In *Nanoscale Imaging, Sensing, and Actuation for Biomedical Applications XVI*. 2019, 10891, 34-41.
126. Huang TJ, Yang DS, Fraser PE, Chakrabartty A. Alternate aggregation pathways of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide: an in vitro model of preamyloid. *J Biol Chem*. 2000, 275(46):36436-36440.
127. Gagnon P, Nian R, Lee J, Tan L, Latiff SM, Lim CL, Chuah C, Bi X, Yang Y, Zhang W, Gan HT. Nonspecific interactions of chromatin with immunoglobulin G and protein A, and their impact on purification performance. *J Chromatogr A*. 2014, 1340:68-78.
128. Gagnon P, Nian R, Yang Y, Yang Q, Lim CL. Non-immunospecific association of immunoglobulin G with chromatin during elution from protein A inflates host contamination, aggregate content, and antibody loss. *J Chromatogr A*. 2015, 1408:151-60.
129. Wetzel R, Becker M, Behlke J, Billwitz H, BöHM S, Ebert B, Hamann H, Krumbiegel J, Lassmann G. Temperature behaviour of human serum albumin. *European Journal of Biochemistry*. 1980, 104(2):469-478.
130. Fratrić N, Jovčić-Milošević N, Ilić V, Stojić V. The levels of immune complexes in the blood sera of calves in the neonatal period and in adult cattle. *Acta Veterinaria*. 2006, 56(2-3):103-110.
131. Digeon M, Laver M, Riza J, Bach JF. Detection of circulating immune complexes in human sera by simplified assays with polyethylene glycol. *J Immunol Methods*. 1977;16(2): 165-183.
132. Hasková V, Kaslík J, Ríha I, Matl I, Rovenský J. Simple method of circulating immune complex detection in human sera by polyethylene glycol precipitation. *Z Immunitätsforsch Immunobiol*. 1978, 154(4): 399-406.
133. Stefanović G, Marković D, Ilić V, Brajović G, Petrović S, Milošević-Jovčić N. Hypogalactosylation of salivary and gingival fluid immunoglobulin G in patients with advanced periodontitis. *J Periodontol*. 2006, 77(11):1887-1893.
134. Brajović G, Stefanović G, Ilić V, Petrović S, Stefanović N, Nikolić-Jakoba N, Milošević-Jovčić N. Association of fibronectin with hypogalactosylated immunoglobulin G in gingival crevicular fluid in periodontitis. *J Periodontol*. 2010, 81(10):1472-1480.
135. Barer R, Tkaczyk S. Refractive index of concentrated protein solutions. *Nature*. 1954, 821-822.
136. Benveniste J, Bruneau C. Detection and characterization of circulating immune complexes by ultracentrifugation. Technical aspects. *J Immunol Methods*. 1979, 26(2):99-112.

137. Yohannes G, Wiedmer SK, Elomaa M, Jussila M, Aseyev V, Riekkola ML. Thermal aggregation of bovine serum albumin studied by asymmetrical flow field-flow fractionation. *Anal Chim Acta*. 2010, 675(2):191-8.
138. Ghadami SA, Ahmadi Z, Moosavi-Nejad Z. The albumin-based nanoparticle formation in relation to protein aggregation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2021, 252:119489.
139. Raynal B, Lenormand P, Baron B, Hoos S, England P. Quality assessment and optimization of purified protein samples: why and how?. *Microbial cell factories*. 2014, 13(1):180.
140. Nash JT, Davies KA. Complement and Immune Complexes. *Methods Mol Biol*. 2000, 150: 203-214.
141. Poulton TA, Mooney NA, Nineham LJ, Hay FC. Characteristics of immune complexes detectable by two independent assays in gynaecological malignancies. *Clin Exp Immunol*. 1983, 53:573-580.
142. Monay NA, Hay FC, Poulton TA. A comparative study of complement components in polyethylene glycol precipitated immune complexes from patients with ovarian cancer and patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 1983, 52:561-568.
143. Robinson MW, Scott DG, Bacon PA, Walton KW, Coppock JS, Scott DL. What proteins are present in polyethylene glycol precipitates from rheumatic sera? *Ann Rheum Dis*. 1989, 48:496-501.
144. Clogston JD, Patri AK. Zeta Potential Measurement. In: McNeil S, editor. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. *Methods in Molecular Biology*, vol 697. Humana Press. 2011.
145. O'Brien RW. Electroacoustic studies of moderately concentrated colloidal suspensions. *Faraday Discuss Chem Soc*. 1990, 90:301-12.
146. Lu GW, Gao P. Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery. In: Kulkarni VS (Ed) *Handbook of non-invasive drug delivery systems*. William Andrew Publishing. 2010, 59-94.
147. Luik AI, Naboka YuN, Mogilevich SE, Hushcha TO, Mischenko NI. Study of human serum albumin structure by dynamic light scattering: two types of reactions under different pH and interaction with physiologically active compounds. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 1998, 54A(10):1503-7.
148. Satish L, Millan S, Das S, Jena S, Sahoo H. Thermal aggregation of bovine serum albumin in conventional buffers: an insight into molecular level interactions. *Journal of Solution Chemistry*. 2017, 831-848.
149. Rondeau P, Armenta S, Caillens H, Chesne S, Bourdon E. Assessment of temperature effects on beta-aggregation of native and glycosylated albumin by FTIR spectroscopy and PAGE: relations between structural changes and antioxidant properties. *Arch Biochem Biophys*. 2007, 460(1):141-50.
150. Borzova VA, Markossian KA, Chebotareva NA, Kleymenov SY, Poliansky NB, Muranov KO, Stein-Margolina VA, Shubin VV, Markov DI, Kurganov BI. Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin. *PloS one*. 2016, 11(4), e0153495.
151. Lin JJ, Meyer JD, Carpenter JF, Manning MC. Aggregation of human serum albumin during a thermal viral inactivation step. *Int J Biol Macromol*. 2009, 45(2):91-6.
152. Laurent AD, Assfeld X. *Interdiscip Sci Comput Life Sci*. 2010, 2: 38.
153. Borzova VA, Markossian KA, Kleymenov SY, Kurganov BI. A change in the aggregation pathway of bovine serum albumin in the presence of arginine and its derivatives. *Sci Rep*. 2017, 7(1):3984.
154. Page M, Thorpe R. Purification of IgG using Protein A or Protein G. In: Walker JM, editor. *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press; 2002.
155. Forsgren A, Sjöquist J. "Protein A" from *S. aureus*: I. Pseudo-immune reaction with human  $\gamma$ -globulin. *J Immunol*. 1966, 97(6):822-827.

156. Van Loghem E, Frangione B, Recht B, Franklin EC. Staphylococcal protein A and human IgG subclasses and allotypes. *Scand J Immunol.* 1982, 15(3):275-8.
157. Johansson PJ, Ota T, Tsuchiya N, Malone CC, Williams RC Jr. Studies of protein A and herpes simplex virus-1 induced Fc gamma-binding specificities. Different binding patterns for IgG3 from Caucasian and Oriental subjects. *Immunology.* 1994, 83(4):631-8.
158. Sasso EH, Silverman GJ, Mannik M. Human IgA and IgG F(ab')<sub>2</sub> that bind to staphylococcal protein A belong to the VHIII subgroup. *J Immunol.* 1991, 147(6):1877-1883.
159. Sasso EH, Silverman GJ, Mannik M. Human IgM molecules that bind staphylococcal protein A contain VHIII H chains. *J Immunol.* 1989, 142(8):2778-2783.
160. Peng Z, Becker AB, Simons FE. Binding properties of protein A and protein G for human IgE. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994, 104(2):204-6.
161. Zikán J, Zavázal V, Krauz V. Heterogeneity of human polyclonal IgE reacting with staphylococcal protein A. *Folia Microbiol (Praha).* 1984, 29(3):264-8.
162. Tada M, Aoyama M, Ishii-Watabe A. Fcγ Receptor Activation by Human Monoclonal Antibody Aggregates. *J Pharm Sci.* 2020, 109(1):576-583.
163. Gagnon P, Nian R, Leong D, Hoi A. Transient conformational modification of immunoglobulin G during purification by protein A affinity chromatography. *J Chromatogr A.* 2015, 1395:136-42.
164. Tosi MM, Ramos AP, Esposto BS, Jafari SM. Dynamic light scattering (DLS) of nanoencapsulated food ingredients. In: Jafari SM, editor. *Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients.* Vol. 4. Academic Press; 2020. p. 191–211.
165. Wriedt T. Mie theory: a review, in: W. Hergert, T. Wriedt (Eds.), *The Mie Theory*, Springer Series in Optical Sciences, vol. 169, Springer, Berlin, Heidelberg. 2012.
166. Pope RM, Teller DC, Mannik M. The molecular basis of self-association of antibodies to IgG (rheumatoid factors) in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974, 71(2):517-21.
167. Kauffmann RH, Van Es LA, Daha MR. Aggregated human immunoglobulin G stabilized by albumin: a standard for immune complex detection. *J Immunol Methods.* 1979, 31(1-2):11-22.
168. Knutson DW, Kijlstra A, Lentz H, van Es LA. Isolation of stable aggregates of IgG by zonal ultracentrifugation in sucrose gradients containing albumin. *Immunol Commun.* 1979, 8(3):337-45.
169. Murphy RM, Chamberlin RA, Schurtenberger P, Colton CK, Yarmush ML. Size and structure of antigen-antibody complexes: thermodynamic parameters. *Biochemistry.* 1990, 29(49), 10889-10899.
170. Arend WP, Teller DC, Mannik M. Molecular composition and sedimentation characteristics of soluble antigen-antibody complexes. *Biochemistry.* 1972, 11(22), 4063-4072.
171. Ковачић МВ. Структурне и функционалне особине имунокомплекса код телади оболеле од бронхопнеумоније. 2018 (Докторска дисертација, Универзитет у Београду).
172. Khera R, Das N. Complement Receptor 1: disease associations and therapeutic implications. *Mol Immunol.* 2009, 46(5):761-772.
173. Lock RJ, Unsworth DJ. Measurement of immune complexes is not useful in routine clinical practice. *Ann Clin Biochem.* 2000, 37:253-261.
174. Fratrić N, Gvozdić D, Vuković D, Savić O, Buač M, Ilić V. Evidence that calf bronchopneumonia may be accompanied by increased sialylation of circulating immune complexes` IgG. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012, 150:161–168.
175. Buač M, Mojsilović S, Mišić D, Vuković D, Savić O, Valčić O, Marković D, Gvozdić D, Ilić V, Fratrić N. Circulating immune complexes of calves with bronchopneumonia

- modulate the function of peripheral blood leukocytes: In vitro evaluation. *Res Vet Sci.* 2016, 106: 135-142.
176. Lux A, Yu X, Scanlan CN, Nimmerjahn F. Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human FcγRs. *J Immunol.* 2013,190(8):4315-23.
  177. Soltis RD, Hasz DE. The effect of serum immunoglobulin concentration on immune complex detection by polyethylene glycol. *J Immunol Methods.* 1983 Feb 25;57(1-3):275-82.
  178. Imai H, Chen A, Wyatt RJ, Rifai A. Composition of IgA immune complexes precipitated with polyethylene glycol. A model for isolation and analysis of immune complexes. *J Immunol Methods.* 1987 Nov 5;103(2):239-45.
  179. FAQ-calculating volume distributions from dynamic light scattering data. [www.materials-talks.com/intensity-volume-number-which-size-is-correct/](http://www.materials-talks.com/intensity-volume-number-which-size-is-correct/). Посећено: 24 04.2024. године).
  180. [www.malvern.com](http://www.malvern.com) Посећено: 23.04.2024.године
  181. Faggiano S, Ronda SL, Bruno S, Jankevics H, Mozzarelli A. Polymerized and polyethylene glycol-conjugated hemoglobins: a globin-based calibration curve for dynamic light scattering analysis. *Anal Biochem.* 2010;401:266–270.
  182. Djukić T, Drvenica I, Kovačić M, Minić R, Vučetić D, Majerić D, Šefik-Bukilica M, Savić O, Bugarski B, Ilić V. Dynamic Light Scattering Analysis of Immune Complexes in Sera of Rheumatoid Arthritis Patients. *Anal. Biochem.* 2023, 674, 115194.
  183. Hari SB, Lau H, Razinkov VI, Chen S, Latypov RF. Acid-induced aggregation of human monoclonal IgG1 and IgG2: molecular mechanism and the effect of solution composition. *Biochemistry.* 2010;49(43):9328–9338.
  184. H. Franey, S.R. Brych, C.G. Kolvenbach, R.S. Rajan. Increased aggregation propensity of IgG2 subclass over IgG1: role of conformational changes and covalent character in isolated aggregates. *Protein Sci.* 2010;19(8):1601–1615.
  185. N. Naseraldeh, R. Michelis, M. Barhoum, J. Chezar, T. Tadmor, A. Aviv, L. Shvidel, A. Litmanovich, M. Shehadeh, G. Stemer, E. Shaoul, A. Braester. The role of alpha 2 macroglobulin in IgG-aggregation and chronic activation of the complement system in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Front. Immunol.* 2020;11:603569.
  186. Djukić T, Drvenica I, Kovačić M, Milanović S, Majerić D, Šefik-Bukilica M, Miletić M, Bugarski B, Ilić V. Exploring the Link between Hydrodynamic Size and Immunoglobulins of Circulating Immune Complexes in Rheumatoid Arthritis Patients. *International Journal of Molecular Sciences.* 2024, 25(6), 3138.
  187. Armstrong JK, Wenby RB, Meiselman HJ, Fisher TC. The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation. *Biophys. J.* 2004, 87, 4259–4270.
  188. Djukic T, Drvenica I, Maslovaric I, Markovic D, Kovacic M, Minic R, Milanovic S, Bugarski B, Ilic V. Dynamic light scattering analysis of in vitro formed immune complexes, Cost Action CA21160, ML4 NGP, P34. In *Proceedings of the 1st Meeting on Machine Learning and Non-Globular Proteins*, Bratislava, Slovakia, 5–7 July 2023.
  189. Menikou S, McArdle AJ, Li MS, Kaforou M, Langford PR, Levin M. A proteomics-based method for identifying antigens within immune complexes. *PLoS One.* 2020 Dec 23;15(12):e0244157.
  190. Kaca W, Gleńska-Olender J, Konieczna I, Gawęda J, Sęk S. Assessment of *Proteus mirabilis* Antigen Immunological Complexes by Atomic Force Microscopy. *Methods Mol Biol.* 2019;2021:273-283.
  191. Roux KH. Immunoglobulin structure and function as revealed by electron microscopy. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;120(2):85-99.
  192. Sandin S, Ofverstedt LG, Wikström AC, Wrange O, Skoglund U. Structure and flexibility of individual immunoglobulin G molecules in solution. *Structure.* 2004 Mar;12(3):409-15.

193. Czajkowsky DM, Shao Z. The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009,106(35):14960-5.
194. Hiramoto E, Tsutsumi A, Suzuki R, Matsuoka S, Arai S, Kikkawa M, Miyazaki T. The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein. *Sci Adv.* 2018;4(10):eaau1199.
195. van Schie KA, Kruithof S, Ooijevaar-de Heer P, Derksen NI, van de Bovenkamp FS, Saris A, Vidarsson G, Bentlage AEH, Jiskoot W, Romeijn S, Koning RI, Bos E, Stork EM, Koeleman CAM, Wuhrer M, Wolbink G, Rispen T. Restricted immune activation and internalisation of anti-idiotypic complexes between drug and antidrug antibodies. *Annals of the rheumatic diseases.* 2018, 77(10), 1471-1479.
196. Lei D, Liu J, Liu H, Cleveland TE 4th, Marino JP, Lei M, Ren G. Single-Molecule 3D Images of "Hole-Hole" IgG1 Homodimers by Individual-Particle Electron Tomography. *Sci Rep.* 2019 Jun 20;9(1):8864.

**ПРИЛОГ 1**

**Табела П1.** Демографски и клинички подаци, ниво С1С и релативни садржај имуноглобулина у С1С особа са реуматоидним артритисом и терапија која је примана у време узимања узорка крви.

Старост (године)	Пол	RF (IU/mL)	АСРА (RU/mL)	SE (mm/h)	CRP (mg/L)	DAS 28	С1С (A <sub>350</sub> )	IgM	IgA	IgG	(релативни садржај у С1С )				Терапија
											IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	
56	Ж	4	291	18	/	3,83	0,350	0,54	1,08	0,88	/	/	/	/	мето трексат, лефлуномид
57	Ж	86	619	18	5,4	3,41	0,250	0,57	1,07	0,91	/	/	/	/	мето трексат, преднизон
26	Ж	123	500	4	4,5	1,25	0,246	1,11	1,56	1,17	/	/	/	/	без терапије
67	М	46	220	/	/	/	0,312	0,59	0,79	0,75	0,76	0,98	0,59	0,70	мето трексат, преднизон
49	М	0	0	14	10,0	3,06	0,352	0,93	0,82	0,85	/	/	/	/	мето трексат, преднизон, фебукостат, хидроксицхлорокин
56	М	121	447	12	4,9	2,95	0,911	1,4	1,32	1,02	0,62	0,77	0,92	0,68	лефлуномид
62	Ж	0	0	6	5,7	3,26	0,387	1,01	0,88	1,02	1,01	0,91	1,05	0,76	мето трексат, преднизон
53	Ж	277	113	10	2,1	1,61	0,418	1,15	1,20	0,81	0,64	0,69	0,74	0,56	лефлуномид, преднизон, хидроксицхлорокин
76	Ж	74	47	68	27,5	5,61	1,223	1,36	1,49	0,65	2,16	1,07	1,50	0,83	сулфасалазин
62	Ж	74	67	28	16,0	5,04	0,492	1,69	1,25	1,17	2,65	0,86	1,64	0,96	мето трексат, преднизон
64	Ж	62	793	28	38,7	4,28	0,621	1,92	2,14	1,40	2,20	1,36	2,26	1,43	мето трексат, преднизон
67	Ж	108	328	50	102,3	4,95	0,615	1,17	1,23	1,27	1,28	1,06	1,20	0,59	мето трексат, преднизон
74	Ж	51	167	50	19,1	5,04	0,267	0,79	1,56	0,98	1,32	0,81	1,42	1,13	мето трексат, преднизон
71	Ж	91	50	28	11,5	/	0,857	1,19	0,98	0,87	0,62	0,69	0,71	0,37	мето трексат, преднизон
68	Ж	68	33	50	36,4	4,44	1,699	1,2	1,35	0,96	0,99	1,10	0,69	1,08	мето трексат, преднизон
70	Ж	33	1	52	24,1	4,17	0,720	0,98	0,84	0,78	0,85	0,96	0,78	0,60	мето трексат, преднизон, хидроксицхлорокин
30	Ж	11	304	28	4,1	4,26	0,482	0,87	1,15	1,10	1,40	1,39	1,47	1,25	мето трексат
63	Ж	1	25	/	/	3,14	0,173	0,53	0,87	0,81	0,65	0,42	1,56	0,28	мето трексат, сулфасалазин
65	Ж	0	0	32	4,1	/	2,228	0,97	1,69	1,21	1,84	1,15	1,24	0,97	без терапије
69	Ж	128	298	42	10,5	5,51	0,789	1,59	2,1	1,64	3,67	2,66	2,83	1,40	мето трексат, хидроксицхлорокин
70	Ж	142	1180	10	/	/	0,314	0,85	1,97	1,13	3,30	1,77	0,91	1,08	преднизон
64	Ж	198	174	56	17,9	2,85	1,021	1,33	1,67	1,24	1,33	1,03	2,46	1,24	мето трексат, преднизон, хидроксицхлорокин
70	Ж	0	0	11	9,5	3,96	0,549	1,15	1,34	1,28	2,04	0,91	1,61	1,06	мето трексат, преднизон, хидроксицхлорокин
69	Ж	361	500	50	0,00	5,65	0,213	0,71	1,55	1,00	1,25	1,56	1,19	1,14	мето трексат, хидроксицхлорокин
62	Ж	0	0	14	5,4	3,24	0,18	0,36	1,18	0,90	0,87	0,63	0,97	0,95	мето трексат, хидроксицхлорокин
57	Ж	140	485	18	3,2	5,32	0,273	0,68	1,13	1,00	1,06	0,35	1,05	0,34	мето трексат, преднизон, хидроксицхлорокин
62	Ж	4	1	8	18,9	/	0,331	0,51	0,61	0,83	0,72	0,46	1,56	0,42	без терапије
60	Ж	76	759	46	12,9	2,82	0,219	0,56	1,43	0,89	1,08	0,94	1,07	1,63	мето трексат, преднизон, хидроксицхлорокин
74	Ж	69	27	12	7,1	/	0,781	0,42	1,01	0,91	1,83	0,55	0,46	1,07	мето трексат, сулфасалазин, хидроксицхлорокин
74	М	136	432	54	30,0	/	0,523	1,42	1,59	1,18	/	/	/	/	лефлуномид, хидроксицхлорокин

SE - Брзина седиментације еритроцита; CRP - Ниво С-реактивног протеина у периферној крви; DAS 28 - Активност болести (Disease activity score 28).

RF - Ниво укупних реуматоидних фактора у серуму одређен нефелометријски, комерцијалним RF II тестом (Mindray, Кина); Гранична вредност теста: 14 IU/mL, узорак са вредностима мањим 14 IU/mL се сматра RF негативним; Изотип RF није одређиван.

АСРАs - Ниво серумских IgG антитела на цитрулинисане пептиде одређен комерцијалним ELISA тестом (EUROIMMUN Schweiz AG, Швајцарска). Циљни антигени: циклични цитрулинисани пептиди; Гранична вредност: 5 RU/mL; узорак са вредностима мањим 5 IU/mL се сматра АСРА негативним.

С1С OD350 - Ниво С1С, изражен као апсорбанција на 350 nm (A<sub>350</sub>) протеина серума преципитираних 3% PEG након ресолубилизације фосфатним пуфером.

## ПРИЛОГ 2

Табела П2. Старост, пол, титар серумских RF, ниво СИС и релативни садржај имуноглобулина у СИС здравих особа.

Старост (године)	Пол	RF (IU/mL)	СИС (A <sub>350</sub> )	IgM	IgA	IgG	(релативни садржај у СИС)			
							IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
64	Ж	1,5	0,201	0,16	0,09	0,43	0,39	0,44	0,55	0,34
66	М	/	0,075	0,14	0,23	0,62	0,37	0,48	0,95	0,34
53	Ж	3,2	0,032	0,04	0,06	0,27	0,33	0,43	0,47	0,34
65	Ж	/	0,697	0,98	1,79	1,23	1,86	1,70	1,44	1,26
67	М	/	0,919	1,51	1,23	1,06	1,11	1,66	1,18	0,97
58	Ж	/	0,934	1,61	1,02	1,28	1,29	1,60	1,06	0,84
64	М	/	0,833	1,46	1,22	1,12	1,80	1,30	1,40	1,04
28	Ж	/	0,424	0,88	0,69	0,89	1,33	1,32	0,68	0,90
67	М	/	0,540	0,34	1,17	0,78	0,59	1,47	0,74	1,06
55	Ж	/	0,215	0,71	0,79	0,79	0,82	0,69	0,73	0,78
52	Ж	2,3	0,237	1,16	0,93	0,85	1,25	1,09	0,77	0,84
58	Ж	4,5	0,510	1,16	1,32	0,82	0,62	1,23	0,40	1,08
69	М	1,0	0,261	0,8	1,41	1,01	0,92	0,88	0,58	0,97
67	М	16,9	0,392	0,97	1,19	1,15	0,69	1,55	0,49	0,99
71	Ж	0,0	1,202	1,07	1,55	1,13	1,71	1,32	0,84	0,86
48	М	1,8	0,293	0,58	0,78	0,88	0,76	0,83	0,45	0,77
45	Ж	0,6	0,421	1,02	0,65	1,00	0,82	0,71	0,49	0,53
61	М	/	0,967	0,66	1,43	1,11	0,92	0,92	0,59	0,81
43	М	1,0	0,182	1,08	0,52	0,86	0,55	0,36	0,56	0,31
22	Ж	3,7	0,450	0,54	0,41	0,63	0,42	0,35	0,60	0,56
50	Ж	1,2	0,535	0,59	1,04	0,74	0,39	0,37	0,44	0,23
60	Ж	4,2	0,391	0,74	0,88	0,83	0,38	1,63	1,70	0,26
51	Ж	4,2	0,285	0,47	0,65	0,73	0,62	1,15	1,74	0,53
35	Ж	4,5	0,153	0,62	0,55	0,67	0,20	0,53	1,42	0,68
65	М	3,3	0,430	0,53	0,45	0,8	0,86	0,88	1,46	0,54
22	Ж	1,3	0,254	0,71	1,07	0,78	0,71	0,99	0,98	0,95
34	Ж	0,7	0,118	0,49	0,87	0,87	0,39	1,31	1,27	0,51
50	Ж	6,0	0,354	1,07	0,48	1,02	1,07	0,64	1,01	0,28
69	М	3,6	1,108	0,88	1,27	1,22	1,74	2,91	2,78	0,85
62	Ж	/	0,503	1,28	1,41	1,29	1,33	0,68	2,93	0,35

СИС OD350 - Ниво СИС, изражен као апсорбанција на 350 nm (A<sub>350</sub>) протеина серума преципитираних 3% PEG, након ресулбулизације фосфатним пуфером.

Релативни садржај имуноглобулина у СИС одређен је дот блотом.

ПРИЛОГ 3

Табела ПЗ. Фотон корелациона спектроскопија: Анализа појединачних СИС здравих особа

D <sub>n</sub> (nm)	Број честица у СИС здравих особа																																	
	SIS_1	SIS_2	SIS_3	SIS_4	SIS_5	SIS_6	SIS_7	SIS_8	SIS_9	SIS_10	SIS_11	SIS_12	SIS_13	SIS_14	SIS_15	SIS_16	SIS_17	SIS_18	SIS_19	SIS_20	SIS_21	SIS_22	SIS_23	SIS_24	SIS_25	SIS_26	SIS_27	SIS_28	SIS_29	SIS_30				
1,7																															1			
2,0																																		
2,3																																		
2,7																																		
3,6																																		
4,2							1																											
4,8																																		
5,6			1								2																				1			
6,5	1										1																				1			
7,5	1						1				2				1																2			
8,7		1	1				4	1		1	3								1	1	1		1								1			
10,1	3		1		1				1		1							1	4	2											3			
11,7	1	1								2		2	1	2	1										1						3			
13,5			2		2				1		2	2	1	3																	2			
15,7	1		1	2	1	1	4	2	1		3	2	2	1	1	1	1	2	1	1		1	2								2			
18,2	2		1	2	4		1					3	1	1	1	1	3	1					1			2	4	2	1					
21,0	2		1	1	2				1	2		1	3	2	1						1										2			
24,4			2	1	1	1		1		1	1	3			2	3	1	1	2			4	1		1	3	3	1	3		3			
28,2		1	2							4	1																							
32,7	1	3	1	1		1		2	1		2				2		2					1	2								2			
37,8	1	4	1	1	1		6	1	1	1	3				2	2		1	3			1	2								5			
43,8	1	2	1	1	1		3		1	1	3				2	1	2		1	1		3	5		1	1	1	2	4	2	2			
50,8	4		1	2	1		1		2	2	2			1		1	2		1	2		2	2		1	2					2			
58,8					2	1		3	1		1	4	3	2			1					1												
68,1	1		1			1		1		2		1	2	1	1	2	1	2	1	2		2	2	1	2	1	1	1	1					
78,8	5		2	1	1			1	2		1	2	5	1	1	1	1	5	2	1		4	1		1	4	2	3	1	1	1			
91,3			1								2	2	4	1	1	1	2	4	2	1														
106				2	1						3														3									
122		1	2	4	1		1	1	1		1	1				2	3	1			1	4	1	1	1						1			
142		4	2		2						3	1	1			1																		
164		5		1	1		2				1					2	3		3			2		1	2	1					1			
190	1			1	1					1					1		1				2		1	2	1									
220			1	1	2		1								2	1	1						4		1						1			
255					1						1				2	3																		
295				1			2								3	3		1		1					1	1						1		
342				1			1					1			3			2		2					1	1						1		
396						1	3			2					1		1	4															1	
459			3		1				1		1	1	1	2						1	1				1	2						1		
531									1		2	2	1	2						3												1		
615	1	1	1						2	5		5	2																			1		
712	1			1					1		2	1	1					1	1													1		
825	1			3	1	1	3		1			2			3		3	3														1		
955	1		1		1						2	1	2			1	2			3		4	5	1								1		
1106	3	2		2		1			1	2		2	1					3				2										1		
1281	1	2		1								1					1	2		1														
1484	1	1		1	1						1						1	3		1														
1718		1			1				1								1																1	
1990		2		1		1			1						1		1	1					1			1							1	
2305		1							1								1																	
2669																																		1
3091									1																									1
3580																																		1
4145															4																			1
4801	2					1									1																			

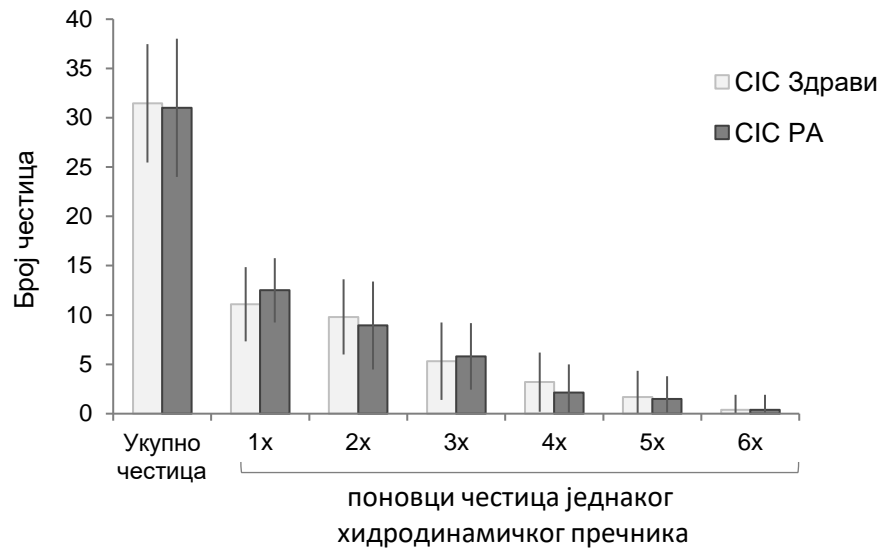


ПРИЛОГ 4

Табела П4. Фотон корелациона спектроскопија: Анализа појединачних особа са РА

D <sub>n</sub> (nm)	Број честица у СИС особа са РА																													
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30
1,7																														
2,0																														
2,3																														
2,7																														
3,6							1												1	1		1								
4,2																				1	1		1							
4,8																										1				
5,6								1		2											1				1					
6,5		1	1								2										1									
7,5	1				1						1		1								1		3			1		1		
8,7		1		1	1			1		1		2	3	1						4		3		3		1		1		
10,1	1				4		1		2	1	4	2	3	5	1				2	4		1		3		2		3		
11,7					2	1		1	1	2	2	1	3	3	1				2	2	2		2		1	1	2		1	
13,5	1	1					2	2	1		1	1	2	1	1				1	2	1	1		1		1	1			
15,7				4		1	5		1	1		3	3	1	1				2	2	1		1		1	1	1	2		
18,2		1	1	1	1	2		1	3	2	2	3	1					2				1	3	1	1	1	1			
21,0	3	2		1	2	2		3	1	2	2	1	2	2	1			1		2		3			1	1	1	4		
24,4	1	2	3		1	1	2	2	2	2	2	1	1	1					1			2	3	1		2	1			
28,2	1		5	1	2	1	1	2	1	3	1	1	1	3	3	1		3	1	2		2		1	1	1		1		
32,7	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6	2	1			2	1	2	3		1						1	
37,8	1			1			1	3	1	1				2	1	1	3		3	1		2			2	3	2			
43,8	3				1	2		1	1	1				1	2	2	2	2	1	1	1		3	2	2	1	1			
50,8		1			6	1	1			1	1	2	1	2	1			2		2			5	5	2	2	2		1	
58,8			1	3		1	4			1	1	2	2	1			2	1				1	2	2	1	1	1		1	
68,1		1		1			3	1		1	1			2	1							2	1	1	1	1	4	1		
78,8		2		1								5		1	1				1	2				1		2	4		2	
91,3	1							1	3	1	3	3		3	1	1			1	2	3	2	4	1	1	2	2			
106	2	2			3			2	3			2	3	1		1		1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	
122	1	3	1		3		1	3		5	1	1	1	1	1		1	4	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	5	
142	1			1	1	2		1	1	1	4	2		1		1		2		1	1	1			1	3	3	1	1	
164	1	1			1	2		2		1		1					1		1	1	1				2	3	3	2	1	
190	3				1					1	1						1		1	1		2	1		1	1	2	2		
220	1		1							1		1	1	1	1			1	1	1		2	1		1	1	1	1		
255																														
295		1				2	1			1	1											1			3	2		1		
342			1		1	2		1		1		1	1			1	2				1	1		1			1	1		
396	1	1			1	1														2		1	1	1			2		1	
459		1	1		2	3			1	1	3					2	2		1	1		2	1	1	1			1		
531	1	1	2			1		3	3	2	2				1	1	1	1				2	1	1	1	1		2	2	
615	1				1	1		4	2	2	2		3		1	1	1	1	2		1	1					4	4		
712		1			1			2	1	2	1		2	1	1	1	2	1	1	1	1		1	1		1	1	1		
825		2				1		1	3	1		1	1	2	1	2	2						3	1		1	1	1		
955	1				1		1		1	2			3		2				1		1		4	1		1	1	1		
1106	3					1			1			1		2	1		2			2	1	1				1	1	1		
1281	2	1	1			1			1				1	1		1		2		2		3	1		1	1		2		
1484	1	1	1				2							2	1		2		1			1			1	1	1			
1718	1		1				2		1			2		2		1		2		1				1		1	1			
1990	1	1		2										1	1	1				1						1				
2305															1				1											
2669																	1		1											
3091																														
3580																														
4145				1																									1	
4801																														

ПРИЛОГ 5



Слика П1. Фотон корелациона спектроскопија: Средњи број поновака честица истог хидродинамичког пречника у СИС особа са РА и СИС здравих особа.

ПРИЛОГ 6

Табела П5. Фотон корелациона спектроскопија: Нумерички подаци за слику 5.22.

(а) СИС честице				(б) Појединачни СИС					
Дн (nm)	Број		p	Здрави		РА		p	
	Здрави	РА		са	без	са	без		
1,7	1		n.s.						
2,7		1	n.s.			30	0		n.s.
3,6		4	n.s.			26	4		n.s.
4,2	1	1	n.s.			29	1		n.s.
4,8	1	1	n.s.			29	1		n.s.
5,6	4	5	n.s.			26	4		n.s.
6,5	6	9	n.s.			24	6		n.s.
7,5	11	11	n.s.			21	9		n.s.
8,7	19	25	n.s.			16	14		n.s.
10,1	23	28	n.s.			16	14		n.s.
11,7	17	21	n.s.			18	12		n.s.
13,5	28	23	n.s.			13	17		n.s.
15,7	31	27	n.s.			15	15		n.s.
18,2	29	23	n.s.			14	16		n.s.
21,0	26	30	n.s.			14	16		n.s.
24,4	35	30	n.s.			12	18		n.s.
<b>28,2</b>	19	36	<b>0,019</b>			10	<b>20</b>	<b>0,019</b>	
32,7	26	33	n.s.			10	<b>20</b>		n.s.
37,8	35	27	n.s.			15	15		n.s.
<b>43,8</b>	42	25	<b>0,081</b>			14	16		n.s.
50,8	30	32	n.s.			16	14		n.s.
58,9	26	24	n.s.			15	15		n.s.
68,1	25	26	n.s.			15	15		n.s.
78,8	49	32	n.s.			13	17	<b>0,095</b>	
91,3	31	25	n.s.			18	12		n.s.
106	25	29	n.s.			12	18		n.s.
<b>122</b>	30	<b>39</b>	n.s.			11	19		n.s.
142	23	26	n.s.			12	18		n.s.
164	26	22	n.s.			15	15		n.s.
190	13	12	n.s.			22	8		n.s.
220	15	15	n.s.			16	14		n.s.
255	10	11	n.s.			23	7		n.s.
295	14	13	n.s.			20	10		n.s.
342	13	16	n.s.			16	14		n.s.
396	20	15	n.s.			18	12		n.s.
459	17	21	n.s.			16	14		n.s.
<b>531</b>	14	26	<b>0,067</b>			13	17	<b>0,067</b>	
615	22	32	n.s.			13	17		n.s.
<b>712</b>	15	24	<b>0,069</b>			10	<b>20</b>	<b>0,069</b>	
825	35	24	n.s.			14	16		n.s.
955	36	22	n.s.			16	14		n.s.
1106	29	19	n.s.			17	13		n.s.
1281	15	21	n.s.			15	15		n.s.
1484	15	14	n.s.			20	10		n.s.
<b>1718</b>	7	18	n.s.			17	13		n.s.
1990	10	8	n.s.			23	7		n.s.
2305	6	3	n.s.			27	3		n.s.
2669	3	3	n.s.			27	3		n.s.
3091	1	2	n.s.			29	1		n.s.
3580	8	2	n.s.			28	2		n.s.
4145	3	2	n.s.			28	2		n.s.
4801	4		n.s.			30			n.s.
<b>Max</b>	<b>49</b>	<b>39</b>		<b>Max</b>	<b>24</b>	<b>20</b>			

n.s. - p > 0,10; разлика није статистички значајна





## Листа скраћеница и ознака коришћених у докторској дисертацији

- ACPA Anti-citrullinated peptide antibodies*; Антитела против цитрулинираних пептида  
*AFM Atomic Force Microscopy*; Микроскопија атомских сила  
*BCA Bicinchoninic Acid*; Бицинхолинска киселина  
*C1q Component 1q*; Компонента 1q (део комплекса у систему комплемента)  
*CBG Coomassie brilliant blue*; комаси плаво  
*CH Constant region of the Heavy chain*; Це терминални домен тешког ланца имуноглобулина  
*CIC Circulating immune complexes*; Циркулишућих имунокомплекси  
*CL Constant region of the Light chain*; Це терминални домен лаког ланца имуноглобулина  
*CR1 receptor Complement receptor type 1 (CD35)*; Рецептор за комплемент тип 1 (CD35)  
*CRP C-Reactive Protein*; Це реактивни протеин  
*DAS 28 Disease activity score-28*; Скор активности болести-28  
*DLS Dynamic light scattering*; Динамичко расипање светлости  
*DMARDs Disease-modifying antirheumatic drugs*; Лекови који модификују ток реуматске болести  
*ECL Enhanced chemiluminescence*; Појачана хемилуминисценција  
*FcR Fragment crystallizable receptor*; Рецептор за кристализабилни фрагмент  
*FcαRI: Fc alpha receptor 1*; Рецептор за Fc део имуноглобулина IgA  
*H Heavy*; тешки ланци молекула имуноглобулина  
*HPLC High-Performance Liquid Chromatography*; Течна хроматографија високих перформанси  
*IgG Immunoglobulin G*; Имуноглобулин G  
*IgM Immunoglobulin M*; Имуноглобулин M  
*IgA Immunoglobulin A*; Имуноглобулин A  
*IgD Immunoglobulin D*; Имуноглобулин D  
*IgE Immunoglobulin E*; Имуноглобулин E  
*L Light*; лаки ланци молекула имуноглобулина  
*NET neutrophil extracellular traps*; Неутрофилне екстрацелуларне мреже  
*PBS Phosphate buffered saline*; Пуферисани физиолошки раствор  
*PCS Photon Correlation Spectroscopy*; Фотон корелациона спектроскопија  
*PEG Polyethylene Glycol*; Полиетилен гликол  
*RA Rheumatoid arthritis*; Реуматоидни артритис  
*RF Rheumatoid factor*; Реуматоидни фактор  
*S-S Disulfide Bonds*; Дисулфидне везе  
*SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; Натријум додецилсулфат полиакриламид гел електрофореза  
*SEM Scanning electron microscope*; Скенирајућа електронска микроскопија  
*TBS Tris buffered saline*; Раствор NaCl пуферизован TRIS  
*TBS-Tween Tris Buffered Saline with Tween-20*; Раствор NaCl пуферизован TRIS са додатком Tween-20  
*TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethane*; Трис-хидроксиметил-аминометан  
*V Variable domain of immunoglobulin molecule*; Варијабилни домен молекула имуноглобулина  
*VL Variable domain of the Light chain*; Варијабилни домен лаког ланца молекула имуноглобулина  
*VH Variable domain of the Heavy chain*; Варијабилни домен тешког ланца молекула имуноглобулина  
 $\zeta$ ; Електрокинетички (зета) потенцијал

## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Тамара Н. Ђукић, магистар фармације, рођена је 27.06.1994. године у Крушевцу. Основну и средњу школу завршила је у Варварину са одличним успехом. Интегрисане академске студије фармације завршила је 2018. године, са просечном оценом 9,23 на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Додатно, 2022. године завршила је мастер студије на Факултету инжењерских наука Универзитета у Крагујевцу (смер: Бионжењеринг) са просечном оценом 9,86 и тиме стекла звање мастер инжењер биомедицинског инжењеринга.

Докторске академске студије је уписала школске 2019/2020. године на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Од августа 2020. године запослена је у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета у Београду као истраживач приправник, док је у мају 2023. године стекла звање истраживач сарадник.

Тамара Н. Ђукић је била учесник Еразмус+ програма мобилности у трајању од 3 месеца (јун-септембар 2021) на Пољопривредном факултету Универзитета у Атини (*Agricultural University of Athens, Greece*) у лабораторији за хемију (*Department of Food Science and Human Nutrition*).

Ангажована је на пројекту *MultiPromis - Multifunctional leaf protein and assembled nanoparticle structures delivered by enzyme technology (7751519)* којим руководи проф. др Зорица Кнежевић-Југовић у оквиру програма „Идеје“ Фонда за науку Републике Србије. Учесник је COST акције CA21160 *Non-globular proteins in the era of Machine Learning (ML4NGP)*.

Као резултат досадашњег рада, као аутор или коаутор, објавила је један рад у врхунском међународном часопису (M21), један рад у истакнутом међународном часопису (M22), један рад у међународном часопису (M23), као и 9 радова саопштених на домаћим и међународним скуповима штампаних у изводу.

# Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Тамара Н. Ђукић

Број индекса 4033/2019

## Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 16.09.2024.

---



# Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тамара Н. Ђукић

Број индекса 4033/2019

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада **„Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“**

Ментори Др Верица Ђорђевић, доцент

Др Весна Илић, научни саветник

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 16.09.2024.

---

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 16.09.2024.

---

## Оцена извештаја о провери оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма IThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Стандардизација фотон корелационе спектроскопије као методе за одређивање величине имунокомплекса у дијагностичке сврхе“ аутора и кандидата **Тамаре Н. Ђукић**, магистра фармације, констатујемо да утврђено подударање текста износи **6%**. Од тога највећи део подударности произилази из докторске дисертације др Маријане Ковачић из 2018. године (389 речи, око 1%). С обзиром на то да су обе докторске дисертације имале за циљ испитивање истог типа макромолекулских комплекса (имунокомплекса), али који су потицали из различитих врста (човек и говеда), у различитим патолошким стањима (реуматоидни артритис и бронхопнеумнија) и применом различитих метода, овај проценат је последица коришћења стандардизованих стручних термина и назива коришћених метода и њихових скраћеница, инструмената и цитата који су наведени у докторској дисертацији. Део подударности се односи и на претходно публиковане резултате истраживања који су проистекли из дисертације докторанда. Ни са једним литературним наводом није установљено подударање веће од 1%.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. Став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Београд, 26. септембар 2024.

Ментори

---

др Верица Ђорђевић, доцент

Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

др Весна Илић, научни саветник

Универзитет у Београду, Институт за медицинска истраживања,

Институт од националног значаја за Републику Србију