

# Značaj određivanja koncentracije komponente komplementa C1q u pacijenata sa sistemskim eritemskim lupusom

---

Ljubić, Lovro

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:259524>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Lovro Ljubić

**Značaj određivanja koncentracije komponente  
komplementa C1q u pacijenata sa sistemskim  
eritemskim lupusom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Désirée Coen Herak, spec. med. biokem. i lab. medicine.

*Zahvaljujem doc. dr. sc. Désirée Coen Herak na ukazanome povjerenju, podršci i strpljenju pri izvođenju ovog diplomskog rada. Također bih želio zahvaliti svima sa Odjela za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju, Odjela za laboratorijsku imunologiju te Odjela za opću kliničku biokemiju i analitiku cerebrospinalne tekućine Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku bez čije pomoći izrada ovog diplomskog rada ne bi bila moguća.*

*Hvala i svim prijateljima s fakulteta na kavama koje smo popili tijekom ovih 5 godina, kao i onima koje ćemo još popiti. Veliko hvala mami Blanki na neprestanoj podršci, kako akademskoj, tako i životnoj. Naposljetku, hvala mojoj Jeleni, uz koju sam gradio sve ono najbolje što imam.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. SUSTAV KOMPLEMENTA .....	1
1.1.1. Funkcija, aktivacija i regulacija sustava komplementa .....	1
1.1.2. Komponente komplementa C1q, C3 i C4.....	4
1.1.2.1. Komponenta komplementa C1q .....	4
1.1.2.2. Komponenta komplementa C3 .....	6
1.1.2.3. Komponenta komplementa C4 .....	7
1.2. SISTEMSKI ERITEMSKI LUPUS .....	7
1.2.1. Etiologija i epidemiologija SLE.....	8
1.2.2. Genetske promjene u SLE .....	8
1.2.3. Okolišni čimbenici i hormonski utjecaj u SLE.....	9
1.2.4. Sustav komplementa u SLE.....	10
1.2.5. Kliničke manifestacije SLE .....	12
1.2.6. Lupusni nefritis .....	14
1.3. IMUNOKEMIJSKE METODE .....	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	21
3. MATERIJALI I METODE.....	22
3.1. ISPITANICI.....	22
3.2. UZORCI .....	22
3.3. KALIBRATORI.....	23
3.4. KONTROLNI UZORCI .....	24
3.5. OPREMA I REAGENSI.....	25
3.6. METODE.....	25
3.7. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA .....	26
4. REZULTATI.....	27
4.1. OPĆE KARAKTERISTIKE ZDRAVIH ISPITANIKA .....	27
4.2. OPĆE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA S DIJAGNOZOM SLE .....	28
4.3. AKTIVNOST SLE I ZAHVAĆENOST BUBREGA .....	30
4.4. KRIVULJE OPERATIVNIH KARAKTERISTIKA.....	36
4.5. PODJELA U SKUPINE PREMA REFERENTNIM INTERVALIMA .....	40

5. RASPRAVA .....	42
6. ZAKLJUČCI.....	48
7. POPIS KRATICA OZNAKA I SIMBOLA.....	49
8. LITERATURA .....	51
9. SAŽETAK/SUMMARY .....	57
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	59

# 1. UVOD

## 1.1. SUSTAV KOMPLEMENTA

### 1.1.1. Funkcija, aktivacija i regulacija sustava komplementa

Sustav komplementa otkriven je u kasnom 19. stoljeću. Otkriće se pripisuje belgijskom imunologu Julesu Bordetu koji ga opisuje kao termolabilnu komponentu plazme koja nadopunjava, odnosno komplementira, baktericidno djelovanje antitijela (Janeway i sur., 2001.). Više od stotinu godina kasnije, sustav komplementa prepoznat je kao ključan dio urođenog imuniteta. Čini ga više od 30 proteina koji se nalaze otopljeni u plazmi ili su prisutni na staničnim membranama (Noris i Remuzzi, 2013.).

Ključne uloge sustava komplementa su:

- opsonizacija patogena, apoptotskih stanica i staničnog otpada
- proizvodnja anafilatoksina, kemotaksijskih signala te modulatora upale
- liziranje stanica patogena
- uklanjanje imunokompleksa

Osim navedenih funkcija, otkriveno je kako sustav komplementa sudjeluje i u održavanju homeostaze, metabolizmu, zacjeljivanju, staničnom preživljavanju te sinaptičkom obrezivanju. Svoje funkcije komplement ispoljava u organima kao što su oči, koža, mozak, bubrezi, probavni trakt, krvožilni sustav, pluća te u usnoj šupljini (Kareem i sur. 2023.). Iz navedenoga je vidljivo kako se radi o izrazito važnom i vrlo raširenom sustavu.

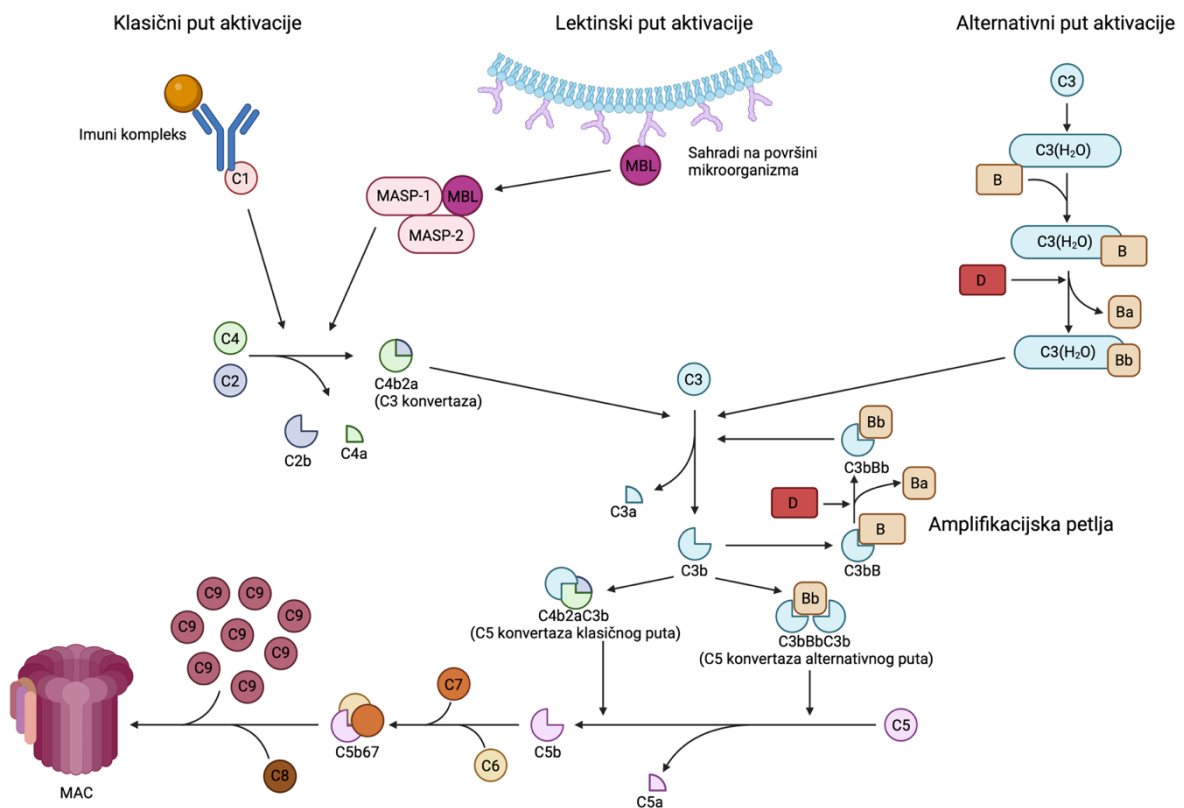
Aktivacija sustava komplementa odvija se kroz slijed lančanih reakcija, odnosno kaskadama. Razlikujemo tri puta aktivacije komplementa: klasični, alternativni i lektinski put. Sva tri puta aktivacije završavaju terminalnim putem koji dovodi do nastanka kompleksa koji napada membranu (engl. *membrane attack complex*, MAC).

**Klasični put aktivacije** najčešće započinje nastankom imunih kompleksa koje tvore uglavnom antitijela klasa G i M. Jednom kada nastane imuni kompleks, C1q komponenta kompleksa C1 se veže za regiju antitijela Fc, što aktivira komponentu C1r. U sljedećem koraku komponenta C1r aktivira komponentu C1s koja cijepa komponente C4 i C2. Aktivni fragmenti C4b i C2a se kondenziraju i stvaraju konvertazu C3 (C4b2a), koja dalje u kaskadnom slijedu reakcija aktivira protein C3. Konvertaza C3 cijepa C3 u C3a i C3b, s tim što se C3b dodatno veže na kompleks C4bC2b, te pri tome nastaje konvertaza klasičnog puta C5. Konvertaza klasičnog puta C5 cijepa C5 na fragmente C5a i C5b.

**Alternativni put** započinje hidrolizom proteina C3 te nastaje C3(H<sub>2</sub>O). Konformacijska promjena koja pri tome nastaje otkriva vezno mjesto za faktor B, pa nastaje kompleks C3H<sub>2</sub>OB. Faktor D cijepa faktor B, pri čemu se iz kompleksa oslobađa fragment Ba. Preostali kompleks C3H<sub>2</sub>OBb katalizira cijepanje C3 na C3a i C3b. Kako C3b također ima vezno mjesto za faktor B, nastaje C3bB. Faktor B ponovno je podložan cijepanju od strane faktora D, pri čemu nastaju C3bBb i Ba. Kompleks C3bBb veže properdin, koji ga stabilizira, te započinje sa svojom C3 konvertirajućom aktivnosti. (Macedo i Isaac, 2016.) Ovaj dio alternativnog puta naziva se amplifikacijska petlja, a cilj je nastanje što veće količine C3b. Ovako nastali C3b ostaje vezan u kompleksu C3bBb, odnosno nastaje C3bBbC3b, poznat kao konvertaza alternativnog puta C5. Konvertaza alternativnog puta C5 cijepa C5 na fragmente C5a i C5b.

**Lektinski put** započinje u trenutku kada lektini, poput lektina koji veže manozu (engl. *mannose-binding lectin*, MBL) ili fikolina, dođu u doticaj s površinskim saharidima mikroorganizama (Dodig, 2015.). Vezanjem MBL-a dolazi do konformacijske promjene koja potiče vezanje serinskih proteaza vezanih uz MBL (engl. *MBL-associated serine proteases*, MASP). Kompleks MBL-a i serinskih proteaza djeluje slično kompleksu C1r-C1s, cijepajući C4 i C2 i nastavljajući kaskadu identično klasičnom putu aktivacije.

Sva tri puta aktivacije sustava komplementa završavaju nastankom fragmenata C5a i C5b, čime ulaze u zajednički, odnosno terminalni put. Dok C5a djeluje kao anafilatoksin i kemoatraktant, C5b nastavlja kaskadu. Prvo se za C5b veže C6, a zatim i C7, čime nastaje kompleks C5b67. Ovaj se kompleks usidri u membranu ciljanog patogena ili stanice te veže C8, pri čemu nastaje kompleks C5b678, koji usidren u membrani, na sebe veže veći broj molekula C9, tvoreći MAC (Noris i Remuzzi, 2013.).



Slika 1. Sažeti prikaz sustava komplementa (Created in BioRender. Ljubic, L. (2024) BioRender.com/g32i726)

Neregulirana aktivnost komplementa te njegova reaktivnost na stanice domaćina može dovesti do brojnih neželjenih posljedica i komplikacija. Kako bi se izbjegla prekomjerna aktivacija komplementa, u cirkulaciji te na staničnim membranama prisutni su regulatori komplementa. U Tablici 1. su navedeni regulatori sustava komplementa, njihov smještaj te funkcija (Noris i Remuzzi, 2013.).



Tablica 1. Regulatori sustava komplementa, njihov smještaj i funkcija (prema Noris i Remuzzi, 2013.)

<b>Regulator komplementa</b>	<b>Smještaj</b>	<b>Funkcija</b>
C1 inhibitor	Plazma	Inaktivacija C1r, C1s, MASP-1 i MASP-2
Decay accelerating factor (DAF)	Membranski protein	Destabilizacija C3 i C5 konvertaza
Membrane cofactor protein (MCP)	Membranski protein	Kofaktor faktora I
Faktor H	Plazma	Vežanje za C3b i ubrzavanje razgradnje konvertaza C3 i C5
Faktor I	Plazma	Razgradnja C3b i C4b
Protein koji veže C4	Plazma	Vežanje za C4b i ubrzavanje razgradnje
Receptor komplementa 1	Membranski protein	Kofaktor faktora I, ubrzavanje razgradnje vežanjem za C3b i C4b

MASP: serinska proteaza vezana uz MBL

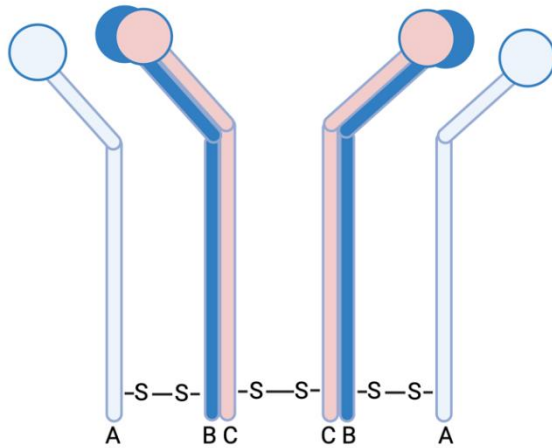
### 1.1.2. Komponente komplementa C1q, C3 i C4

#### 1.1.2.1. Komponenta komplementa C1q

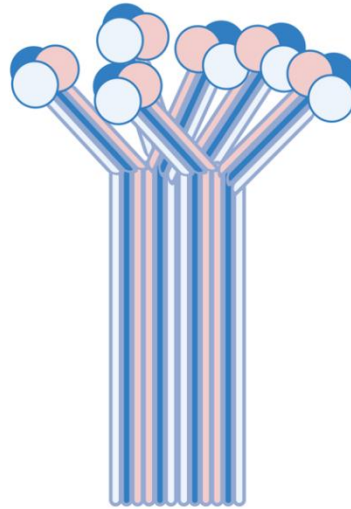
C1q je relativno veliki heksamerni glikoprotein molekulske mase 460 kDa. Molekulu izgrađuju 3 polipeptidna lanca A, B i C koji su produkti 3 zasebna gena smještenih na kromosomu 1p. Svaki lanac na svome N-terminalnom kraju tvori regiju nalik kolagenu, a na C-terminalnom kraju globularnu regiju. U području N-terminalnog kraja molekule lanci tvore disulfidne dimere A-B i C-C. Jednu petlju čini dimer A-B na kojega je nekovalentno vezan lanac C. Lanac C jedne petlje je zatim disulfidno povezan s lancem C susjedne petlje tvoreći dublet A-B C-C B-A. Tri ovakva dubleta povezani su nekovalentnim vezama stvarajući konačan oblik C1q, čije su dvije značajne regije globularna regija, odnosno regija nalik kolagenu. Zanimljivo je da se sinteza C1q primarno ne odvija u jetri, nego u monocitima i makrofagima, epitelnim stanicama, stanicama mezenhima, endotelnim stanicama, fibroblastima i trofoblastima pri čemu je izražen

ili kao ligand vezan za membranu stanice ili se otpušta u međustanični prostor (Ghebrehiwet i sur., 2012.).

**A**



**B**



Slika 2. Prikaz strukture dubleta (A) i cjelovitog C1q glikoproteina (B) (Created in BioRender. Ljubic, L. (2024) BioRender.com/v48y705)

Proučavanjem molekule C1q otkriveno je kako interakciju s ligandima ostvaruje preko glomerularne regije. Primarni ligandi C1q su regije Fc imunoglobulina G (IgG) i M (IgM), prisutnih u imunokompleksima, dok drugi ligandi uključuju C-reaktivni protein (engl. *C-reactive protein*, CRP), pentraksin 3 (engl. *pentraxin 3*, PTX3), fosfatidil-serin i dvolančanu deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) apoptotičnih stanica, lipopolisaharide te bakterijske porine (Reid, 2018.).

Osim započinjanja klasičnog puta aktivacije sustava komplementa, C1q ima i brojne druge funkcije koje su značajne za imunološki sustav, ali i za procese poput angiogeneze, karcinogeneze, cijeljenja rana te preklampsije (Ghebrehiwet i sur., 2012.).

U kontekstu autoimunosti, predložene su dvije hipoteze koje pokazuju značaj komponente komplementa C1q, hipoteza uklanjanja otpada te hipoteza tolerancije na vlastito. Hipoteza uklanjanja otpada odnosi se na sposobnost prepoznavanja apoptotskog otpada te započinjanja fagocitoze. Na ovaj se način potencijalni auto-antigeni uklanjaju prije nego što ih imunski sustav može prepoznati (Scott i Botto, 2015.). Hipoteza tolerancije na vlastito temelji se na regulatornom utjecaju C1q na efektorske stanice unutar imunološkog sustava. Neke od tih regulatornih funkcija uključuju supresiju Th1 i Th17 odgovora posredovanog dendritičkim stanicama i makrofagima (Clarke i sur. 2015.), usmjeravanje polarizacije makrofaga u protuupalni M2 oblik (Benoit i sur., 2012.), sudjelovanje u inhibitornom putu leukocitnog receptora nalik imunoglobulinu 1 (engl. *leukocyte-associated Ig-like receptor-1*, LAIR-1) (Son i Diamond, 2014.) i usmjeravanje dendritičkih stanica u imunosupresivni oblik (Scott i Botto, 2015.).

#### 1.1.2.2. Komponenta komplementa C3

Komponenta komplementa C3 sastoji se od dva polipeptidna lanca, odnosno alfa- i beta-lanca, kovalentno vezanih jedan na drugoga intramolekularnom disulfidnom vezom. Prisutno je ukupno 13 strukturnih domena, no nekolicina proteolitičkih reakcija dovodi do uklanjanja pojedinih dijelova ili cijelih domena što rezultira nastankom različitih fragmenata C3 s različitim strukturama i funkcijama. Produkti tih proteolitičkih reakcija mogu biti fragmenti C3a i C3b, ali i fragment iC3b te mali fragmenti C3c i C3d (Geisbrecht i sur., 2022.). Dio cirkulirajućeg C3 podliježe i spontanoj reakciji hidrolize čime nastaje specifična konformacija nazvana C3(H<sub>2</sub>O). (Ricklin i sur., 2017.)

Vežanjem C3b za ciljnu stanicu nastavlja se proces uklanjanja neželjene stanice ili otpada. To se ostvaruje ne samo stvaranjem konvertaze, već i sam C3b posreduje u funkcijama urođene i stečene imunosti. C3b, ali i iC3b te C3d, predstavljaju vezna mjesta za receptor komplementa (engl. *complement receptor*, CR) 1 kojim se opsonizirani materijal prenosi u slezenu ili jetru. Tkivni makrofagi također izražavaju receptor koji veže C3b te iC3b i inducira fagocitozu. iC3b posjeduje afinitet za još fagocitnih receptora poput CR3 i CR4, dok vežanjem CR2 na površini limfocita B potiče stvaranje memorijskih stanica. C3a je anafilatoksin važan za daljnje usmjeravanje odgovora imunskog sustava, no sudjeluje i u drugim funkcijama poput razvoja i regeneracije tkiva te navođenju hematopoetskih matičnih stanica. Iz navedenoga je vidljiva

važnost dovoljnih količina komponente komplementa C3 pa stoga možda i ne čudi da je upravo C3 jedan od najbrojnijih proteina plazme zdravih ljudi. (Ricklin i sur., 2017.).

### 1.1.2.3. Komponenta komplementa C4

Komponenta komplementa C4 je glikoprotein molekulske mase približno 200 kDa, koji je sastavljen od alfa, beta i gama lanca. Riječ je o ključnoj komponenti klasičnog i lektinskog puta aktivacije komplementa.

U sklopu klasičnog puta, za aktivaciju komponente C4 zaslužan je C1s, dok u lektinskom putu ulogu ima MASP-2. C1s i MASP-2 cijepaju N-kraj alfa-lanca pri čemu nastaju manji C4a fragment te veći C4b fragment. Iako se C4a dugo smatrao anafilatoksinom, to još nije potvrđeno. Utjecaj C4a na monocite i makrofage također nije razjašnjen. Fragment C4b se veže na površinu ciljne stanice te dalje aktivira komponentu C2 s ciljem nastanka C3 konvertaze. C4b može biti proteolitički inaktiviran djelovanjem faktora I, pri čemu nastaje iC4b. iC4b se u daljnjem koraku cijepa na C4d koji ostaje vezan na površini stanice te topljivi C4c. C4c je jedan od potencijalnih biomarkera aktivacije klasičnog i lektinskog puta komplementa, dok C4d djeluje imunosupresivno (Wang i Liu, 2021.).

Serumska koncentracija C4 ovisi o broju genskih kopija gena koji kodiraju za C4. Svaka kopija gena C4 kodira za jedan od 2 izotipa, C4A i C4B. Zanimljivo je da smanjen broj kopija gena koji kodiraju za C4A izotip korelira s razvojem SLE, dok takva poveznica nije prisutna kod C4B izotipa. (Ayano i Horiuchi, 2023.) U slučaju smanjene koncentracije C4 dolazi do neogovarajućeg uklanjanja apoptotičnih stanica, stimulacije mijeloidnih stanica te smanjenog uklanjanja autoreaktivnih limfocita B. (Wang i Liu, 2021.).

## 1.2. SISTEMSKI ERITEMSKI LUPUS

Sistemska eritemski lupus (SLE) je multisistemska autoimuna bolest. Ova složena bolest ima vrlo širok spektar manifestacija, a izmjenjuju se faze remisije i relapsa. Upravo su klinička i serološka heterogenost veliki izazovi kod dijagnoze SLE (Ameer i sur., 2022.). Bolest karakterizira aktivacija i prirodene i stečene imunosti što za posljedicu ima nastanak imunskih kompleksa koji se odlažu u raznim organima.

### 1.2.1. Etiologija i epidemiologija SLE

Najraniji zapis medicinske uporabe izraza lupus nalazi se u biografiji svetog Martina. U njoj je opisano čudesno izlječenje biskupa iz Liegea 855. godine. Riječ lupus dolazi od latinske riječi za vuka, a koristila se zbog prisutnosti lezija koje su izgledale kao da proždiru kožu poput vuka. Kroz iduća stoljeća naziv lupus se koristio za razne bolesti koje su uključivale kožne lezije. Tek 1790. godine lupus se opisuje kao bolest s nodularnim osipom lica koji se razvija u ulceracije. Godine 1952. američki dermatolog John R. Haserick prvi je upotrijebio naziv SLE (Felten i sur., 2020., <https://www.whonamedit.com/doctor.cfm/2168.html>).

Prema procjenama, incidencija SLE u Europi iznosi od 0,3 do 5,1 na 100 000 stanovnika godišnje, a prevalencija od 6,5 do 85,0 na 100 000 stanovnika, što znači kako u Europi 200 000 do 250 000 osoba boluje od SLE (Cornet i sur., 2021.). Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, odnosno Hrvatskog registra o osobama s invaliditetom, 2018. godine su u Republici Hrvatskoj registrirane 134 osobe sa SLE koji je uzrok invaliditeta kod ovih osoba (<https://www.hzjz.hr/sluzba-javno-zdravstvo/svjetski-dan-borbe-protiv-lupusa/>). Incidencija, prevalencija i smrtnost od SLE veći su u žena reproduktivne dobi te ljudi azijskog, afroameričkog i hispanijskog porijekla, u odnosu na osobe bjelačkog porijekla (Barber i sur., 2023.). U žena je rizik od razvoja SLE deset puta veći nego u muškaraca, a odnos oboljelih žena u odnosu na oboljele muškarce iznosi 9:1. Rizik za razvoj SLE u žena smanjuje se nakon menopauze. Također, rizik od razvoja SLE je 14 puta veći u muškaraca s Klinefelterovim sindromom što upućuje na povezanost ove bolesti s kromosomom X, iako točni geni za sada nisu utvrđeni. Unatoč tome što je najčešći u žena reproduktivne dobi, SLE se može pojaviti i u pedijatrijskoj kao i u starijoj populaciji (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535405/>).

Iako etiologija SLE nije poznata, poznate su i dobro su opisane razne genetske promjene, imunološki poremećaji, infekcije te hormonski i okolišni čimbenici koji doprinose razvoju ove bolesti.

### 1.2.2. Genetske promjene u SLE

Patogeneza SLE se sastoji od složene interakcije okolišnih utjecaja i genoma, a rezultat je epigenetska promjena koja mijenja izražaj gena zaslužnih za razvoj bolesti. Korištenjem

cijelogenomskih asocijacijskih studija dokazano je više od 90 genskih lokusa i 730 polimorfizama povezanih sa SLE (Ameer i sur., 2022.). Geni uključeni u razvoj SLE mogu se podijeliti u 4 skupine (Šestan i sur., 2023.);

- gene koji uzrokuju defekte apoptoze, autofagije, popravka DNK, funkcije lizosoma te defekte uklanjanja otpada
- gene koji utječu na signalizaciju putem Toll-u sličih receptora (engl. *Toll-like receptor*, TLR), interferona tipa 1 (IFN-I) i jezgrinog čimbenika kapa B (engl. *nuclear factor κB*, NFκB)
- gene koji utječu na signalizaciju i migraciju imunskih stanica
- gene nepoznate imunološke funkcije.

### 1.2.3. Okolišni čimbenici i hormonski utjecaj u SLE

Okolišni čimbenici predstavljaju vrlo važan dio slagalice razvoja SLE, čemu svjedoči podatak kako je stopa podudarnosti za SLE, odnosno prisutnost bolesti u oba blizanca, među monozigotnim blizancima tek 24% (Deafen i sur., 1992.). Najčešće opisani okolišni čimbenici uključuju izloženost ultraljubičastom (engl. *ultraviolet*, UV) zračenju, pušenje cigareta, infekciju Epstein-Barrovim virusom (EBV), izloženost silicij-dioksidu i silikatima, te izloženost nekim teškim metalima (Perricone i sur., 2016., Barbhaiya i Costenbader, 2016., Gulati i Brumer, 2018.).

Najznačajniji okolišni čimbenik povezan s razvojem SLE je izloženost UV zračenju. Konkretno za SLE, ali i za ostale kožne poremećaje poput opekline i melanoma, najznačajniji je tip zračenja UV B, valnih duljina od 290 do 320 nm (Gulati i Brunner, 2018.). UV B preko imunomodulatornih učinaka te oksidativnog oštećenja doprinosi razvoju bolesti. Imunomodularno djelovanje uključuje induciranje proupalnih citokina, kemotaksijsko poticanje migracije upalnih stanica, induciranje autoreaktivnosti limfocita T CD4 te smanjenje uklanjanja apoptotičkih stanica (Gulati i Brumer, 2018., Ameer i sur., 2022.).

Poveznica između pušenja i razvoja autoimunih bolesti poznata je dugi niz godina. Aktivni pušači imaju veći rizik od razvoja SLE, a rizik korelira s brojem popušanih cigareta u danu i godinama pušenja, dok prestanak pušenja prati pad rizika (Perricone i sur., 2016.). Izloženost

toksičnim komponentama duhanskog dima koje se oslobađaju pušenjem cigareta inducira se oksidativni stres, koji rezultira oštećenjem DNK i nastankom imunogenih DNK adukata. Pušenje također djeluje imunomodulatorno, aktivirajući makrofage i dendritičke stanice te potičući razvoj autoreaktivnih B limfocita (Barbhaiya i Costenbader, 2016., Perricone i sur., 2016.).

Prisutnost antitijela na EBV značajno je češća u osoba oboljelih od SLE nego u zdravih kontrola. Premda su predloženi mehanizmi poput indukcije interferona tipa I proteinskim kompleksima i molekularne mimikrije EBV i antigena SLE, zasad nema podataka koji dokazuju povezanost infekcije EBV i rizikom razvoja SLE (Barbhaiya i Costenbader, 2016., Ameer i sur., 2022.).

Spolni hormoni imaju sposobnost modulacije imunskog odgovora i regulacije opsega tog odgovora. U SLE, testosteron i progesteron imaju zaštitno djelovanje. S druge strane, učinak estrogena se smatra štetnim. Estrogen povećava stvaranje interferona tipa I i potiče preživljenje autoreaktivnih limfocita B, dok istovremeno ometa djelovanje regulatornih limfocita T (Ameer i sur., 2022.). Ovakav utjecaj ženskog spolnog hormona odgovara ranije spomenutoj epidemiološkoj situaciji na globalnoj razini, gdje žene čine većinu oboljelih od SLE. Iako je u žena s postojećim SLE uočena veća razina estrogena i prolaktina u odnosu na zdrave kontrole, povezanost između koncentracija hormona i rizika razvoja SLE nije utvrđena (Barbhaiya i Costenbader, 2016.).

#### **1.2.4. Sustav komplementa u SLE**

Programirana stanična smrt, odnosno apoptoza, jedan je od najvažnijih mehanizama na staničnoj razini, a ključna je u brojnim fiziološkim procesima. To je koordinirani proces stanične smrti koji pri tome ne izaziva lokalnu upalnu reakciju. Raspadom apoptotičkih stanica moguće je otkrivanje sekvestriranih antigena, do tada nepoznatih imunskom sustavu (Lunz Macedo i Isaac, 2016.). Makrofagi i dendritičke stanice tada prepoznaju ove antigene kao strane što pokreće upalnu reakciju, odnosno lučenje proupalnih citokina i nastanak autoreaktivnih limfocita T i B. Dakle, pravovremeno i učinkovito zbrinjavanje apoptotskog otpada od iznimne je važnosti za izbjegavanje razvoja autoimunosti.

Stanični sadržaj oslobođen tijekom apoptoze vežu komponente komplementa poput C1q, C4b te C3b, ali i druge molekule poput pentraksina i kolektina (Lunz Macedo i Isaac, 2016.). Ove opsonine zatim vežu makrofazi i dendritičke stanice putem specifičnih receptora za komponente komplementa čime se ubrzava fagocitoza. Primjerice, C1q se veže za makrofage putem receptora nazvanog kalretikulin i na taj način posreduje uklanjanju potencijalnog izvora autoreaktivnosti (Scott i Botto, 2016.). Osim što ubrzava uklanjanje apoptotskog sadržaja, fagocitoza posredovana opsoninima klasičnog puta djeluje i protuupalno. Na taj način interakcija C1q s dendritičkim stanicama ograničava proizvodnju proupalnih citokina te aktivaciju limfocita T posredovanu dendritičkim stanicama (engl. *dendritic cells*, DC) (Bolouri i sur., 2022.). Osim fagocita, stanični otpad opsoniziran komponentama komplementa uklanja se i drugim stanicama sa specifičnim receptorima kao što je CR1. CR1 veže sve opsonine klasičnog puta, odnosno C1q, C3b, iC3b, C3d te C4b. (Satyam i sur., 2022., Lunz Macedo i Isaac, 2016., Scott i Botto, 2016.) U cirkulaciji se više od 90% CR1 nalazi na eritrocitima koji vezanjem opsoniziranog otpada za CR1 odnose otpad do jetre i slezene gdje se razgrađuje. Na ovaj način učinkovito se izbjegava mogućnost razvoja autoreaktivnosti (Satyam i sur., 2022.) Ukratko, kada je prisutna ravnoteža u stvaranju i uklanjanju apoptotičnih stanica i staničnog otpada, te primjerena aktivacija sustava komplementa, ne dolazi niti do prepoznavanja sekvestriranih antigena niti do upalne reakcije.

U slučaju SLE poremećaj ovog osjetljivog mehanizma se javlja na nekoliko razina, a uključuju deficit komponenata komplementa ranog klasičnog puta, poremećaj fagocitoze, smanjeni izražaj CR1 i pretjeranu potrošnju komplementa (Lunz Macedo i Isaac, 2016., Satyam i sur., 2022., Ayano i Horiuchi, 2023.).

Poznato je dugi niz godina kako je genetski deficit komponenata komplementa ranog klasičnog puta, posebice C1q, C1r/C1s te C4, povezan s razvojem SLE. Od opisanih je slučajeva genetskog manjka komponente C1q 90-93% pacijenata razvilo SLE, dok je kod pacijenata s genetskim deficitom C4 taj postotak 75% (Lunz Macedo i sur., 2016.). Neobično je to što, s jedne strane, deficit ranih komponenata zaslužnih za aktivaciju klasičnog puta vrlo često potiče pojavu SLE, dok je s druge strane, vrlo dobro poznato kako u SLE dolazi do prekomjerne aktivacije sustava komplementa i njegove potrošnje. Upravo se ovo opažanje često naziva „lupus paradoks” (Lunz Macedo i Isaac, 2016., Ayano i Horiuchi, 2023.).



Jedna od karakteristika SLE je smanjenje fagocitoze koja nije popraćena upalnom reakcijom što dovodi do nakupljanja staničnog otpada, naročito ostataka apoptotičnih stanica. Ostatci apoptotičnih stanica uključuju dijelove endoplazmatskog retikuluma, ribosome, ribonukleoproteine te nukleosomsku DNK. Ovakav oslobođeni apoptotski materijal predstavlja sekvestrirane antigene koji se otpuštaju u krvotok te cirkulirajući dovode do razvoja upale i nastanka autoreaktivnih antitijela. Smatra se kako je prvi sekvestrirani antigen koji dovodi do popuštanja tolerancije na vlastito kompleks (H2A-H2B)-DNK (Sterner i sur., 2014.). Poremećaj fagocitoze prisutan je u makrofagima te u neutrofilima, a popraćen je i drugim patološkim promjenama. Razlikujemo dvije vrste makrofaga, klasično aktivirane makrofage M1 koji luče proupalne citokine poput čimbenika tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*, TNF) i interleukina (IL) 12 te alternativno aktivirane makrofage M2 koji luče protuupalne citokine poput IL-10 i IL-4. Poremećaj izražaja ovih tipova makrofaga javlja se zbog povećane prisutnosti proupalnih citokina koja potiče diferencijaciju makrofaga u tip M1 (Ma i sur., 2019.). Također je uočena i pojačana ekspresija gena koji sudjeluju u signalnim putevima aktivacije makrofaga M1 (Herrada i sur., 2019.). Utjecaj na diferencijaciju makrofaga ima i C1q koji, vezan za apoptotske stanice i fagocitiran, potiče lučenje IL-33, promotora M2 odgovora (Benoit i sur., 2012.). U osoba oboljelih od SLE vidljiv je niz poremećaja funkcija neutrofilnih granulocita koji uključuju fagocitozu i stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (Herrada i sur. 2019., Bolouri i sur., 2022., Accapezzato i sur. 2023.). U perifernoj krvi zastupljena je posebna podvrsta neutrofilnih granulocita nazvana granulocitima niske gustoće (engl. *low-density granulocytes*, LDG), koju karakterizira pretjerano stvaranje neutrofilnih izvanstaničnih klopki (engl. *neutrophil extracellular traps*, NETs), mreža koje se sastoje od DNK, histona i nekoliko vrsta neutrofilnih granula. Iako su fiziološki korisne za uništavanje patogena, ove klopke u SLE postaju izvor sekvestriranih antigena, odnosno antigena nukleinskih kiselina (Accapezzato i sur. 2023.). Inače se NETs brzo i učinkovito uklanjaju prije nego što započne imuni odgovor, no u SLE se, zbog ranije spomenute smanjene aktivnosti serumske DNaze I, NETs-i usporeno uklanjaju i ostavljaju prostor razvoju autoreaktivnosti (Herrada i sur., 2019.).

### **1.2.5. Kliničke manifestacije SLE**

SLE karakterizira velika fenotipska raznolikost, a klinička slika može varirati od vrlo blage do po život opasne. Svi organi, odnosno organski sustavi, mogu biti zahvaćen ovom bolesti, iako su glavne manifestacije neki konstitucijski simptomi, mukokutane, muskuloskeletalne,

hematološke, bubrežne, neuropsihijatrijske, plućne, kardiovaskularne, gastrointestinalne i druge manifestacije (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535405/>).

Konstitucijski simptomi su nespecifični simptomi koji se javljaju u različitim bolestima, te nisu specifični za određeni sustav nego odražavaju opće stanje organizma. Konstitucijski simptomi SLE su umor i malaksalost, vrućica nepoznate etiologije te gubitak težine. Ovi su simptomi prisutni u više od 90% oboljelih (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535405/>).

Mukokutane manifestacije su jedne od najprepoznatljivijih obilježja ove bolesti, posebice karakterističan „leptirasti osip” koji je postao svojevrsan simbol ove bolesti. Kožne lezije specifične za lupus dijele se na akutni, subakutni te kronični eritemski lupus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535405/>).

Muskuloskeletalne manifestacije variraju od blagih artralgijskih do deformirajućeg artritisa, pri čemu bol u zglobovima može ličiti reumatoidnom artritisu (Ceccavelli i sur., 2022.).

Hematološke abnormalnosti su uobičajene u oboljelih od SLE, a najčešća je anemija. Česte su i leukopenija, limfopenija te trombocitopenija kao i limfadenopatija i splenomegalija. Za kliničare koji prate razvoj bolesti važno je znati je li određena abnormalnost posljedica same bolesti ili liječenja imunosupresivnim lijekovima (Santacruz i sur., 2022.).

Neuropsihijatrijske manifestacije SLE uključuju središnji i periferni živčani sustav. Mogu varirati od suptilnih kognitivnih poremećaja do akutnih konfuzijskih stanja, napadaja te psihoza no najčešće se radi o glavoboljama, anksioznosti i poremećajima kognicije i raspoloženja (Sarwar i sur. 2021.).

SLE može uzrokovati različite plućne bolesti poput pleuritisa, pleuralne efuzije i akutnog pneumonitisa. Komplikacije ovih stanja mogu biti opasne po život, te je stoga vrlo važna svijest o uključenosti pluća u SLE, kao i aktivno praćenje ovakvih manifestacija (Shin i sur., 2022.).

Abnormalnosti urođene i stečene imunosti, ozljede endotela te neki od rizičnih faktora povezanih sa SLE, poput lupusnog nefritisa, doprinose razvoju preuranjene ateroskleroze, infarktu miokarda, srčanom zatajenju, upalama svih slojeva srčanog mišićja te moždanom udaru (Alghareeb i sur. 2022.).

SLE može zahvatiti bilo koji dio gastrointestinalnog trakta, jetru i gušteraču. Manifestacije mogu biti posljedica samog SLE, terapije uključene u SLE te uzroka nepovezanih sa SLE (Alharbi, 2022.).

### 1.2.6. Lupusni nefritis

Lupusni nefritis (LN) poseban je oblik glomerulonefritisa koji se javlja u osoba oboljelih od SLE. Ujedno je i najčešća i najteža komplikacija, te jedan od najčešćih uzroka smrti u osoba oboljelih od SLE (Alforaih i sur., 2022.). Različiti autori navode različite procjene o pojavnosti LN u SLE, a procjene se kreću uglavnom između 30 i 50% (Hoover i Costenbader, 2016., Ameer i sur., 2022., StatPearls za LN). S obzirom kako je SLE značajno češći u ženskoj populaciji, tako je i LN češći u žena. Djeca oboljela od SLE imaju veći rizik od razvijanja LN od odraslih (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499817/>). Često se LN javlja unutar 5 godina od postavljanja dijagnoze SLE (Alforaih i sur., 2022.).

Etiologija i patogeneza LN-a su još uvijek nejasne, a progresija i odgovor na liječenje značajno variraju, što LN čini izuzetno izazovnom bolesti (Alduraibi i Tsokos, 2024.). Klinička prezentacija LN može varirati od asimptomatske proteinurije pa sve do krajnjeg stadija zatajenja bubrega koje se javlja u 20% pacijenata. Postoji i takozvani „tihi“ LN u kojem nema nikakvih kliničkih promjena unatoč prisutnim histološkim promjenama (Alforaih i sur., 2022.).

Trenutno važeća klasifikacija LN-a se temelji na preporukama Svjetske zdravstvene organizacije i Međunarodnog društva za nefrologiju/ Društva bubrežne patologije. Sustav klasifikacije u obzir uzima promjene glomerularne morfologije, vrstu odloženih imunokompleksa vidljivih imunofluorescentnom metodom te elektronskom mikroskopijom. LN se dijeli u 6 različitih razreda, ukratko opisanih u Tablici 2.

Tablica 2. Klasifikacija lupusnog nefritisa prema <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499817/>

Razred	Naziv	Opis
Razred I	Minimalno mezangijalni	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glomeruli su normalnog izgleda na svjetlosnom mikroskopu</li> <li>• Imunofluorescentna mikroskopija pokazuje depozite imunokompleksa u području mezangija</li> </ul>
Razred II	Mezangijalni proliferacijski	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mezangijalna proliferacija vidljiva pod svjetlosnim mikroskopom</li> <li>• Imunofluorescentna mikroskopija nalik razredu I</li> </ul>
Razred III	Fokalni proliferativni	Imunokompleksi su vidljivi pod imunofluorescentnim mikroskopom u mezangijalnom, subendotelnom i/ili subepitelnom području.
Razred IV	Difuzni proliferativni	Imunokompleksi su vidljivi u mezangijalnom, subendotelnom i/ili subepitelnom području. Lezije mogu biti segmentirane ili globalne.
Razred V	Membranski	Imunokompleksi su vidljivi u mezangijalnom i subepitelnom području, zadebljane petlje kapilara, može sadržavati patologiju razreda III i IV.
Razred VI	Sklerozirajući	Uznapredovali sklerozirajući lupus, većina glomerula je sklerotična.

Smatra se kako je primarni uzrok LN-a stvaranje imunih kompleksa, iako i neke genske komponente mogu uzrokovati predispoziciju u osoba sa SLE za razvoj LN-a (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499817/>). Transkriptomikom pojedinačnih stanica bubrežnog tkiva, Arazi i sur., (2019) su uočili pojačani izražaj gena stimuliranih interferonom u bubrezima u usporedbi sa zdravim kontrolama, što odgovara povećanoj koncentraciji interferona tipa I u osoba oboljelima od SLE. Odgovor na interferon pronađen je i u leukocitima koji infiltriraju bubrege. Dio infiltriranih leukocita čine citotoksični limfociti T i NK stanice. Ove dvije populacije stanica značajan su izvor interferona  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) čime se dodatno potiče razvoj upale u bubregu. Također je dokazana prisutnost limfocita B u više od polovice bioptata ispitanika s LN dok u zdravim kontrolama ova populacija nije uočena. Limfociti B se nalaze u rasponu od naivnih do aktiviranih limfocita B. Periferni monociti mogu ući u ozlijeđeno tkivo i diferencirati u upalne (M1) i protuupalne (M2) makrofage. Ti su makrofagi kronično izloženi molekularnim

uzorcima povezanim s oštećenjem (engl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP) i ligandima TLR zbog čega ne dolazi do razrješenja upale, nego potencijalno nastaju makrofazi s miješanim funkcijama. Posebno je zanimljiva prisutnost makrofaga tipa M2 u LN bubrezima. Iako je načelno protuupalni oblik koji potiče završavanje imunosti reakcije i zacjeljivanje tkiva, Arazi i sur., (2019) smatraju kako u LN makrofagi M2 potiču renalnu infiltraciju i zadržavanje drugih subpopulacija leukocita. Također je zanimljiv nedostatak subpopulacija limfocita T, Th1 i Th17, koji su posebice važni za razvoj SLE. Ovo opažanje upućuje kako polarizacija limfocita T u Th1 i Th17 smjeru nije odlika LN-a (Arazi i sur., 2019.).

Postoje dva pogleda na razvoj LN, odnosno nastanak samih depozita u glomerulu. Oni su vezanje autoantitijela na kromatin već prisutan u glomerulu te direktno vezanje na dijelove glomerula križnom reaktivnošću autoantitijela. Mehanizam koji pomiruje ova dva pogleda temelji se na vezanju autoantitijela za dijelove glomerula križnom reaktivnošću uzrokujući upalu što dovodi do oštećenja struktura i oslobađanja kromatina. Oslobodeni kromatin postaje vezno mjesto za nova autoantitijela razvijajući dalje upalu (Goilav i Putterman, 2015.). Nakupljanje nastalih imunokompleksa aktivira klasični put aktivacije komplementa, odnosno dolazi do vezanja komponente komplementa C1q za imunokomplekse (Alforaih i sur. 2015., Alduraibi i Tsokos, 2024.). Osim anti-DNK antitijela, uočeno je kako i anti-CRP te anti-PTX3 antitijela također koreliraju s aktivnosti LN-a (Hoover i Costenbader, 2016.). Pretjerana aktivacija klasičnog puta komplementa imunokompleksima i vezanjem C1q za svoje ligande, primarno imunokomplekse, dolazi do potrošnje C1q odnosno smanjenja njegove serumske koncentracije (Alduraibi i Tsokos, 2024.). Nadalje, vezanjem C1q nastaje promjena konformacije tog proteina i otkrivanja novih sekvenciranih antigena u regiji nalik kolagenu, za koju se vežu nova anti-C1q antitijela. Anti-C1q antitijela se vežu isključivo za C1q koji je prethodno vezan za neki od svojih liganda. Dijkstra i sur., (2023) su istražili kako interakcija anti-C1q -C1q dalje doprinosi razvoju LN-a te uočili kako anti-C1q antitijela vezana na komponentu komplementa C1q doprinose aktivaciji receptora Fc, konkretno FcγRIIIa. Vezanje FcγRIIIa za komplekse koji sadrže C1q povećalo se 20-60% (Dijkstra i sur., 2023.). Dijkstra i sur., (2023) te Sterner i sur., (2014) ističu važnost ne samo sustava komplementa, već i receptora Fcγ (FcγR) u razvoju oštećenja bubrega. FcγR je heterogena skupina membranskih glikoproteina sa značajnom ulogom u regulaciji procesa poput fagocitoze, degranulacije, izražaja citokina i kemokina, klirensa imunokompleksa te staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o antitijelima (engl. *antibody dependent cell cytotoxicity*, ADCC). FcγRIIIa vrlo učinkovito veže multimerne IgG i imunokomplekse, a izražen je na monocitima, makrofagima, prirodnim

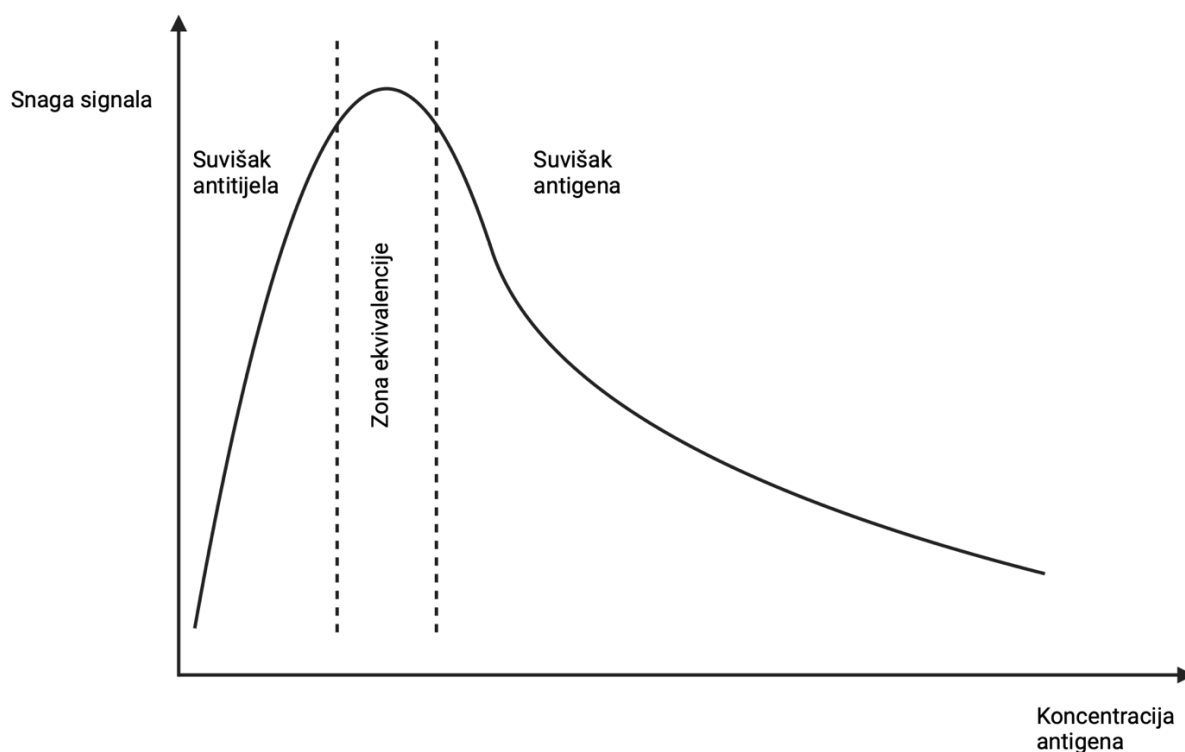
stanicama ubojicama te dendritičkim stanicama gdje djeluje aktivirajuće. Poticanje Fc $\gamma$ RIIIa preko anti-C1q antitijelom moglo bi potaknuti ove stanice na daljnje poticanje upale i uništavanje strukture glomerula procesima poput ADCC (Li i sur., 2009., Sterner i sur., 2014.).

### **1.3. IMUNOKEMIJSKE METODE**

Imunokemijske metode su razvijene kao praktična primjena spoznaja stečenih iz širokog polja imunokemije. Polazna točka svih imunokemijskih metoda je interakcija antigena i antitijela koja se nekovalentnim vezama povezuju preko aktivnih mjesta nazvanih epitop na antigenu, te paratop na antitijelu. U imunokemijskim metodama koriste se dvije vrste antitijela, poliklonska i monoklonska. Poliklonska antitijela prepoznaju mnoge epitope što omogućuje detekciju više antigena, dok monoklonska anti

tijela prepoznaju specifične epitope na ciljnim molekulama i vežu ih s velikim afinitetom. Imunokemijske metode dijelimo na izravne i posredne imunokemijske metode. Izravne imunokemijske metode se temelje na detekciji reakcije antigen-antitijelo, dok se kod posrednih imunokemijskih metoda na temeljnu reakciju antigena i antitijela nadovezuje indikatorska reakcija.

Interakcija antigena i antitijela rezultira nastankom kompleksa antigen-antitijelo, dok će daljnje interakcije ovisiti o njihovim početnim koncentracijama. Za stvaranje netopljivog kompleksa u otopini, potrebno je postići optimalan omjer antigena i antitijela, odnosno postići takozvanu zonu ekvivalencije. Svojstvo kompleksa antigen i antitijelo da percipitira u zoni ekvivalencije osnova je za otkrivanje i određivanje koncentracije analita u većini izravnih imunokemijskih metoda.



Slika 3. Heidelberger- Kendallova krivulja (Created in BioRender. Ljubic, L. (2024))

Izravne imunokemijske metode dalje se dijele na:

- izravne taložne metode
- izravne metode u gelu te
- izravne metode u otopini.

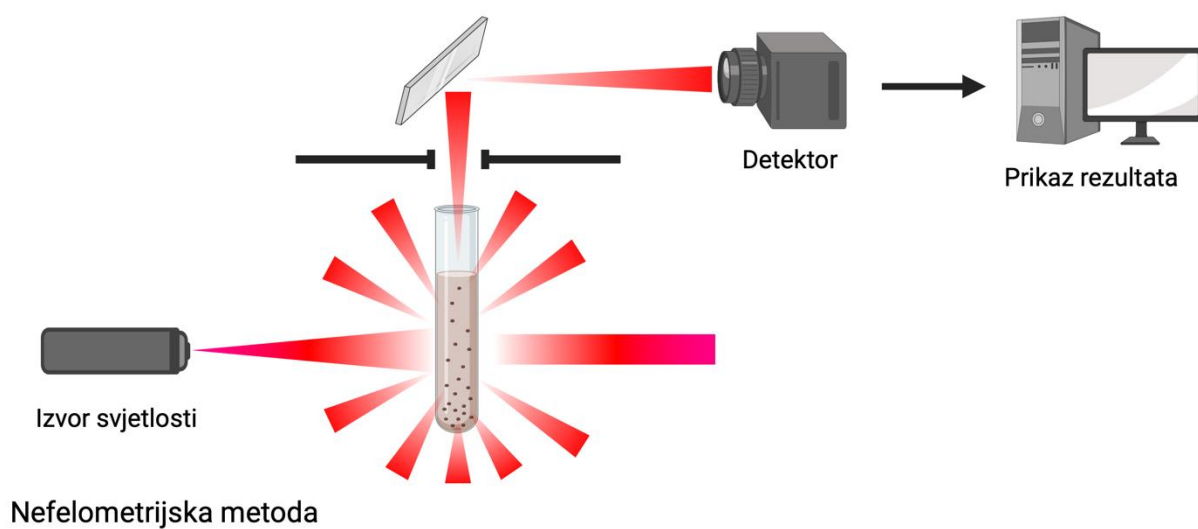
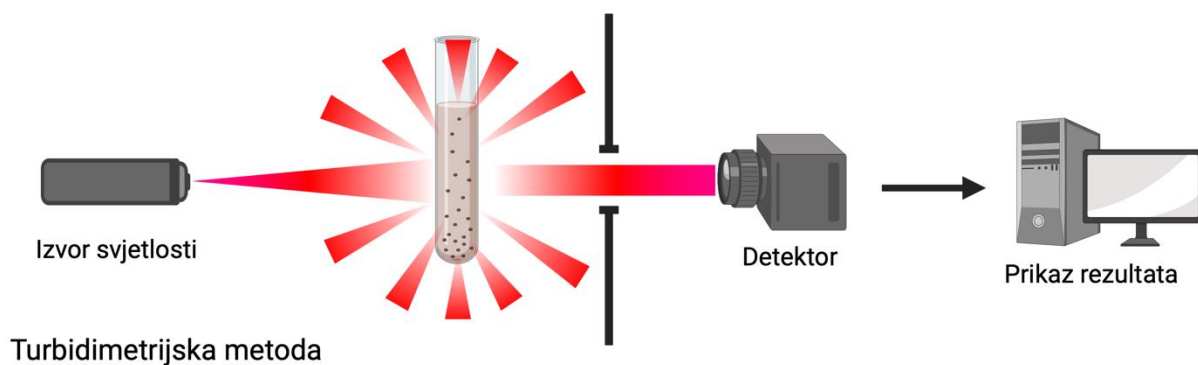
Izravne metode u otopini se temelje na nastanku zamućenja reakcijske smjese kao posljedice nastanka kompleksa analita iz uzorka i antitijela. Pri prolasku zrake svjetlosti kroz zamućenu reakcijsku smjesu, intenzitet svjetlosti se smanjuje te dolazi do raspršenja svjetlosti. Na raspršenje svjetlosti utječu veličina čestica, valna duljina svjetlosti, koncentracija te molekularna masa čestica. Prije nego što se izmjeri intenzitet raspršenja svjetlosti uzrokovan nastankom kompleksa potrebno je izmjeriti bazično raspršenje svjetlosti uzrokovano prisutnošću endogenih proteina i drugih interferirajućih tvari. U drugoj točki mjerenja određuje

se zamućenost nastala zbog nastanka kompleksa. Razlika u jačini svjetlosti očitava se iz prethodno pripremljene kalibracijske krivulje.

Turbidimetrijskom metodom mjeri se zamućenost otopine. Svjetlost koja prolazi kroz turbidimetar ima manji intenzitet od ulazne svjetlosti zbog apsorpcije i refleksije prilikom prolaska kroz zamućenu otopinu. Detektor unutar turbidimetra postavljen je u smjeru prolaska svjetlosti

Nefelometrijskom metodom mjeri se rasap svjetlosti pod određenim kutem. S obzirom na vrlo mali intenzitet raspršene svjetlosti u odnosu na ulaznu svjetlost potrebna je emisija vrlo intenzivne svjetlosti kao i vrlo osjetljivi detektori nefelometra. Detektori koji u nefelometru mjere intenzitet raspršenog svjetla mogu biti smješteni pod kutom od  $30^\circ$  do  $90^\circ$  u odnosu na putanju svjetlosti od izvora, ovisno o intenzitetu ulazne svjetlosti. (Dodig, 2015.)





Slika 4. Shematski prikaz turbidimetrijske i nefelometrijske metode (Created in BioRender. Ljubic, L. (2024) BioRender.com/v19f379)

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Sistemski eritemski lupus (SLE) je složena multisistemska autoimuna bolest s izmjenama faza remisije i relapsa. Njegova najteža komplikacija, lupusni nefritis, predstavlja poseban oblik glomerulonefritisa uzrokovan nastankom i taloženjem imunokompleksa. Sustav komplementa čine više od 30 proteina koji se nalaze u plazmi i na staničnim membranama, a za razvoj SLE posebno su značajne komponente klasičnog puta aktivacije komplementa C1q, C4 i C3. Mnoga istraživanja usmjerena su na otkrivanje novih biomarkera za SLE i lupusni nefritis. Kao potencijalne mete proučavana su serumska autoantitijela, citokini i kemokini u serumu i urinu, molekuli stanične adhezije, mikro ribonukleinske kiseline (miRNA), molekuli komplementa, drugi proteini i lipidi te genetika i epigenetika. Međutim, složena patogeneza ove bolesti otežava razvoj novih biomarkera, pa se postojeći markeri koriste u praksi već 30 godina (Morales i sur. 2021.). Cilj ovog rada bio je utvrditi važnost određivanja koncentracije komponente komplementa C1q kao potencijalnog biomarkera u serumu bolesnika sa SLE-om, te proučiti povezanost s komponentama komplementa C3 i C4, koje su dio rutinske obrade i praćenja bolesnika.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. ISPITANICI**

U istraživanje je bio uključen ukupno 101 ispitanik. Njih 68 bili su pacijenti Zavoda za imunologiju i reumatologiju KBC-a Zagreb, dok su preostalih 33 bili zdravi ispitanici. Uzorci svih ispitanika prikupljeni su u razdoblju od 09. 05. 2023. do 26. 02. 2024. Skupina bolesnih ispitanika sastojala se od 9 muških ispitanika te 59 ženskih ispitanica čiji je raspon dobi iznosio od 21 do 78 godina. Dijagnoze bolesnih ispitanika obuhvaćale su SLE, SLE u remisiji, SLE s lupusnim nefritisom, SLE s miješanom bolesti vezivnog tkiva te SLE sa Sjörgenovim sindromom.

Skupina zdravih ispitanika sastojala se od 14 muških ispitanika te 19 ženskih ispitanica bez poznatih imunoloških poremećaja. Raspon dobi zdravih ispitanika iznosio je od 23 do 64 godine.

#### **3.2. UZORCI**

Kao uzorci za određivanje koncentracija C1q, C3 te C4 kod bolesnih ispitanika korišteni su ostatni uzorci u sklopu rutinske obrade. Uzorci bolesnika uzorkovani su na Zavodu za imunologiju i reumatologiju KBC-a Zagreb, a potom zaprimljeni na Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb. Uzorci zdravih ispitanika uzorkovani su na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb, te je u njima određena koncentracija C1q. Uzorci periferne venske krvi uzorkovani su u epruvete bez antikoagulansa s gelom za odvajanje stanica VACUETTE® volumena 9 mL (Greiner Bio-One GmbH, Austrija) Primarni uzorci su centrifugirani u centrifugi Rotofix 32 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Njemačka) 10 minuta na 4000 okretaja po minuti na sobnoj temperaturi. Po završetku centrifugiranja, za određivanje koncentracije komponente komplementa C1q je odvojeno po 500 µL seruma u mikroepruvetu s poklopcem (Eppendorf Austria GmbH, Austrija) i pohranjeno na -80 °C do analize. Ostatak svježeg uzorka seruma bolesnih ispitanika iskorišten je za određivanje koncentracija komponenti komplementa C3 i C4. Neposredno prije analize C1q,

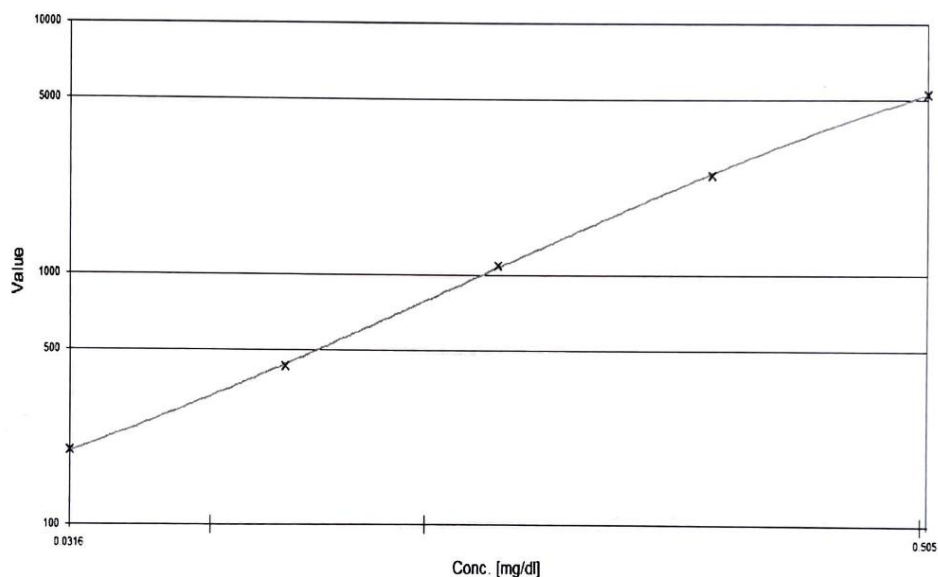
uzorak je otopljen u vodenoj kupelji na temperaturi 37 °C, te dobro promiješan pipetom kako bi se osigurala homogenost uzorka.

### 3.3. KALIBRATORI

Kalibracija analitičkog sustava za određivanje komponente komplementa C1q provedena je korištenjem kalibratora N Latex C1q Kit Low Calibrator (TRIMERO Diagnostics, Španjolska). Kalibracija je provedena automatiziranim razrijeđivanjem kalibratora u pet kalibracijskih točaka, odnosno u razrjeđenjima 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 i 1:160. Nakon provedene kalibracije, kalibrator je pohranjen u hladnjak na temperaturi 4 °C. Tijekom određivanja koncentracije komponente komplementa C1q za potrebe ovog istraživanja kalibracija analitičkog sustava provedena je dva puta. Dobivene kalibracijske krivulje te koncentracije kalibratora nalaze se na Slici 5.

A

Assay 240, C1q\_TD Reference curve released automatically  
 8/31/2023, 2:08:12 PM Mean deviation 1.12 %



Standard  
 670505 C1Q CAL L

Reagents  
 670307 C1q Ab  
 679607 C1q Enh

No.	Dilution	Conc. [mg/dl]	Prereact. [Bit]	First value [Bit]	Value [Bit]	Dev. [%]
1	1:160	0.0316		993	198	0.59
2	1:80	0.0631		1017	429	-1.41
3	1:40	0.126		996	1093	1.59
4	1:20	0.253		1001	2509	-1.49
5	1:10	0.505		1289	5261	0.55

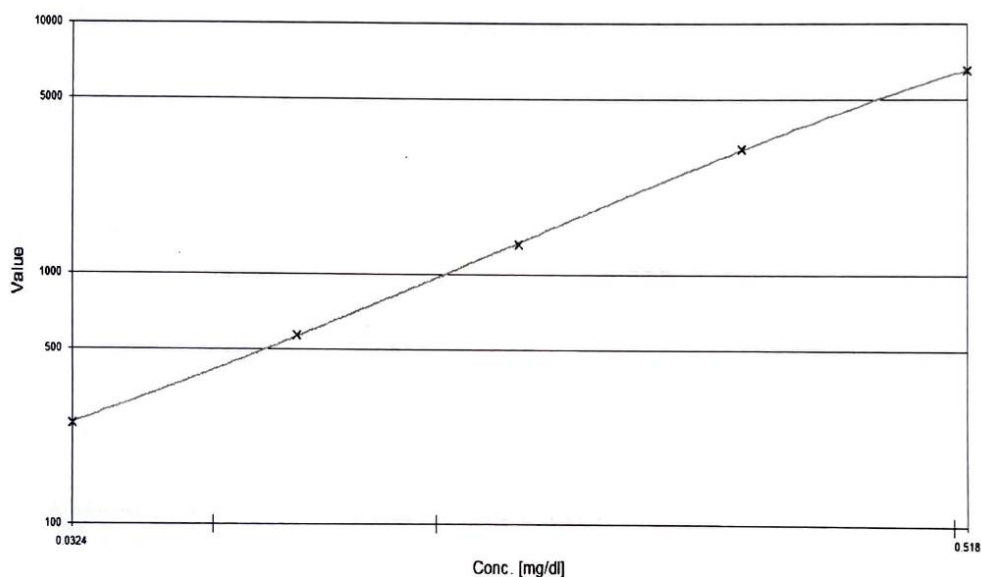
**B**

Assay 240, C1q\_TD

Reference curve released automatically

2/2/2024, 1:08:13 PM

Mean deviation 0.96 %

Standard  
670507 C1Q CAL LReagents  
670311 C1q Ab  
679611 C1q Enh

No.	Dilution	Conc. [mg/dl]	Prereact. [Bit]	First value [Bit]	Value [Bit]	Dev. [%]
1	1:160	0.0324		1050	253	-0.47
2	1:80	0.0648		1053	569	1.28
3	1:40	0.13		1057	1319	-1.32
4	1:20	0.259		1064	3199	1.22
5	1:10	0.518		1196	6545	-0.50

Slika 5. Kalibracijske krivulje za određivanje koncentracije komponente komplementa C1q na analizatoru Atellica® NEPH 630 System (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Njemačka) izrađene 31. 08. 2023. (slika A) te 02. 02. 2024. (slika B)

Kalibracije analitičkog sustava za određivanje komponenti komplementa C3 i C4 provedene su koristeći kalibrator Alinity c Specific Proteins Multiconstituent Calibrator Kit (Abbott Laboratories, Illinois, SAD). Kalibracija je provedena prije svakog novog lota reagensa ili po potrebi, a kalibrator je pohranjen u hladnjak na temperaturi 4 °C.

### 3.4. KONTROLNI UZORCI

Kao kontrolni uzorci za određivanje koncentracije komponente komplementa C1q korištene su dvije razine komercijalnih kontrolnih otopina delipidiranog humanog seruma, N Latex C1q Kit High Control te N Latex C1q Kit Low Control (TRIMERO Diagnostics, Španjolska). Navedeni

kontrolni uzorci su analizirani neposredno prije svake analize serije uzoraka. S obzirom kako su dobiveni rezultati kontrolnih uzoraka bili unutar deklariranih raspona vrijednosti, nije bilo potrebe za popravnim radnjama. Kao i kalibrator, komercijalni kontrolni uzorci su nakon provedene analize pohranjeni u hladnjak na temperaturi 4 °C.

Kontrolni uzorci za komponente komplementa C3 i C4 su Technopath Multichem S Plus Level 1, Technopath Multichem S Plus Level 2 i Technopath Multichem S Plus Level 3 (Technopath Clinical Diagnostics, Irska). S obzirom na to da se radi o rutinskim laboratorijskim pretragama, kontrolni uzorci su analizirani s obzirom na rutinske zahtjeve laboratorija.

### **3.5. OPREMA I REAGENSI**

Za određivanje koncentracije komponente komplementa C1q korišten je nefelometar Atellica® NEPH 630 System (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Njemačka) te pripadajuće reakcijske kivete i stalci, kao i pufer za analizator N Reaction Buffer, otopina za automatizirano razrjeđivanje N Diluent te otopina za čišćenje Cleaner SCS. Za analizu su korišteni reagensi Antiserum Reagent (Ref. TD-42545-RA) u kojem se nalaze Anti-C1q antitijela vezana za polistirenske čestice i Enhancer Reagent (Ref. TD-42545-B) koji sadrži otopinu akceleratora reakcije antitijelo-antigen.

Koncentracije komponenti komplementa C3 i C4 određene su rutinskom imunoturbidimetrijskom metodom na imunokemijskom analizatoru Alinity® ci (Abbott Laboratories, Illinois, SAD). Uzorak seruma se inkubira s puferom (PEG) i odgovarajućim antitijelima, stvarajući netopljive imunokomplekse C3, odnosno C4. Koncentracija C3 odnosno C4 u ispitivanom uzorku određuje se ovisno o stupnju zamućenja.

### **3.6. METODE**

Princip metode za određivanje koncentracije C1q je nefelometrija. Nefelometrijska metoda temelji se na mjerenju raspršenja svjetlosti zbog nastanka netopljivih imunokompleksa u uzorku. Netopljivi imunokompleksi nastaju miješanjem uzorka s reagensom koji sadrži antitijelo, u ovom slučaju anti-C1q antitijelo, vezano na polistirenske čestice. Mjera raspršenja

svjetlosti koju detektiraju fotodetektor proporcionalna je koncentraciji C1q. Koncentracija C1q izračunava se interpolacijom iz baždarne krivulje.

Imunoturbidimetrijskom metodom određena je koncentracija C3 i C4 komponenata komplementa. Zamućenost reakcijske otopine posljedica je nastanka netopljivih imunokompleksa. Razlika intenziteta ulazne svjetlosti i svjetlosti nakon prolaska kroz zamućenu otopinu proporcionalna je koncentraciji analita, očitava se interpolacijom iz baždarne krivulje.

### 3.7. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

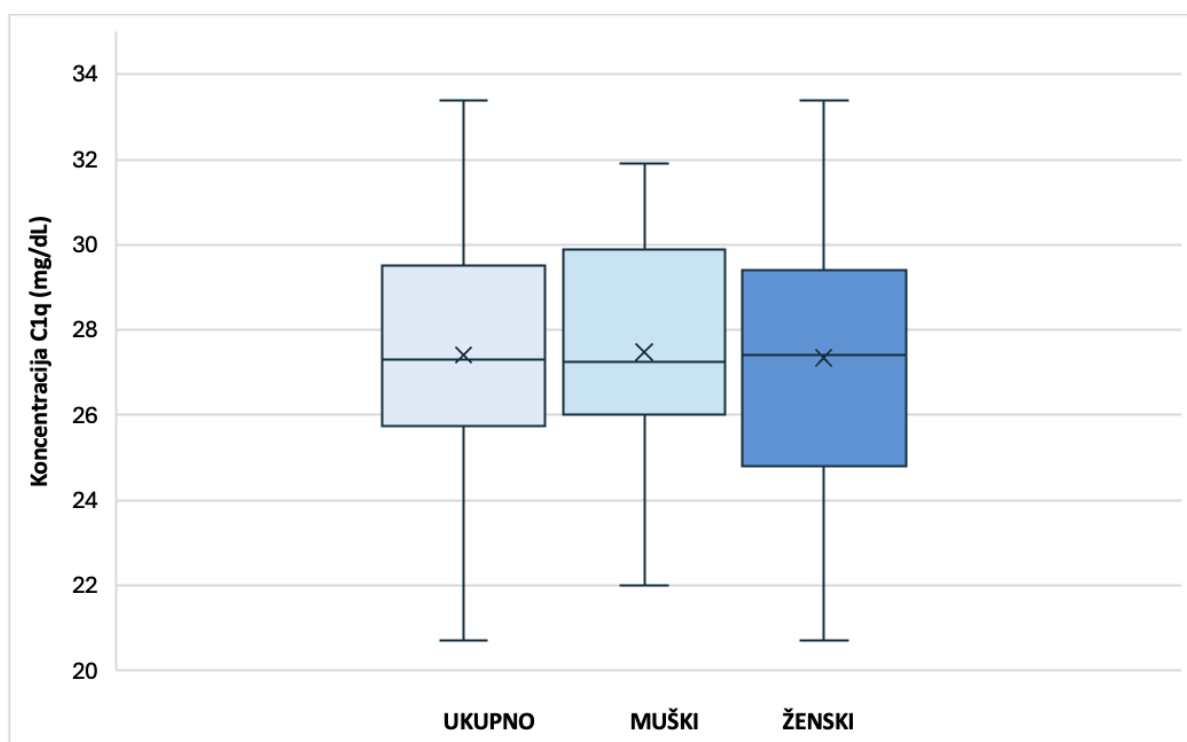
Za statističku obradu podataka korišten je statistički program MedCalc, verzija 22.032 (MedCalc, Belgija) te Microsoft® Excel, verzija 16.89.1. (Microsoft, Washington, SAD). Ispitivanje normalnosti raspodjele kvantitativnih podataka provedeno je Shapiro-Wilk-ovim testom. Prikaz kvantitativnih podataka uključuje srednju vrijednost, standardnu devijaciju, koeficijent varijabilnosti, varijancu, srednju pogrešku srednje vrijednosti, najnižu i najvišu vrijednost te medijan. Statistički značajna razlika između dva skupa kvantitativnih podataka određena je t-testom za nezavisne uzorke, dok je za ispitivanje statistički značajnih razlika između više skupova kvantitativnih podataka korištena analiza varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA). Ispitivanje korisnosti komponente komplementa C1q kao potencijalnog biomarkera ispitano je pomoću krivulja operativnih karakteristika (engl. *receiver operating characteristic*, ROC). Korelacija između dobivenih rezultata ispitana je izračunom Pearsonovog korelacijskog koeficijenta kod parametara s normalnom razdiobom te izračunom Spearmanove korelacije ranga kod parametra koji nisu imali normalnu razdiobu. Statistički značajnim rezultatima u svim provedenim statističkim analizama smatrani su rezultati kod kojih je  $P < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. OPĆE KARAKTERISTIKE ZDRAVIH ISPITANIKA

U istraživanje su bila uključena 33 zdrava ispitanika, od kojih je 14 bilo zdravih muških i 19 zdravih ženskih osoba. Na Slici 1. su kutijastim dijagramom prikazane vrijednosti koncentracija C1q u serumu svih zdravih ispitanika kao i izmjerene vrijednosti ovisno o spolu. Srednja vrijednost koncentracije C1q u serumu zdravih ispitanika iznosila je 27,4 mg/dL pri čemu je srednja vrijednost serumske koncentracije C1q kod zdravih muških ispitanika iznosila 27,5 mg/dL dok je kod zdravih ženskih ispitanika iznosila 27,4 mg/dL.

Referentni interval izračunat je neparametrijskom metodom prema smjernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI*) C28-A3 te iznosi 20,7-33,4 mg/dL.



Slika 6. Vrijednosti koncentracija C1q kod svih zdravih, zdravih muških te zdravih ženskih ispitanika

U Tablici 3. prikazana je deskriptivna statistika rezultata mjerenja koncentracije C1q u serumu 33 zdrava ispitanika te rezultati dobiveni nakon podjele zdravih ispitanika prema spolu.



Shapiro – Wilk-ovim testom utvrđena je normalna razdioba rezultata svih zdravih ispitanika kao i zdravih muških i zdravih ženskih ispitanika, s tim što t-testom za nezavisne uzorke nije utvrđena statistički značajna razlika između muških i ženskih zdravih ispitanika ( $P=0,906$ ).

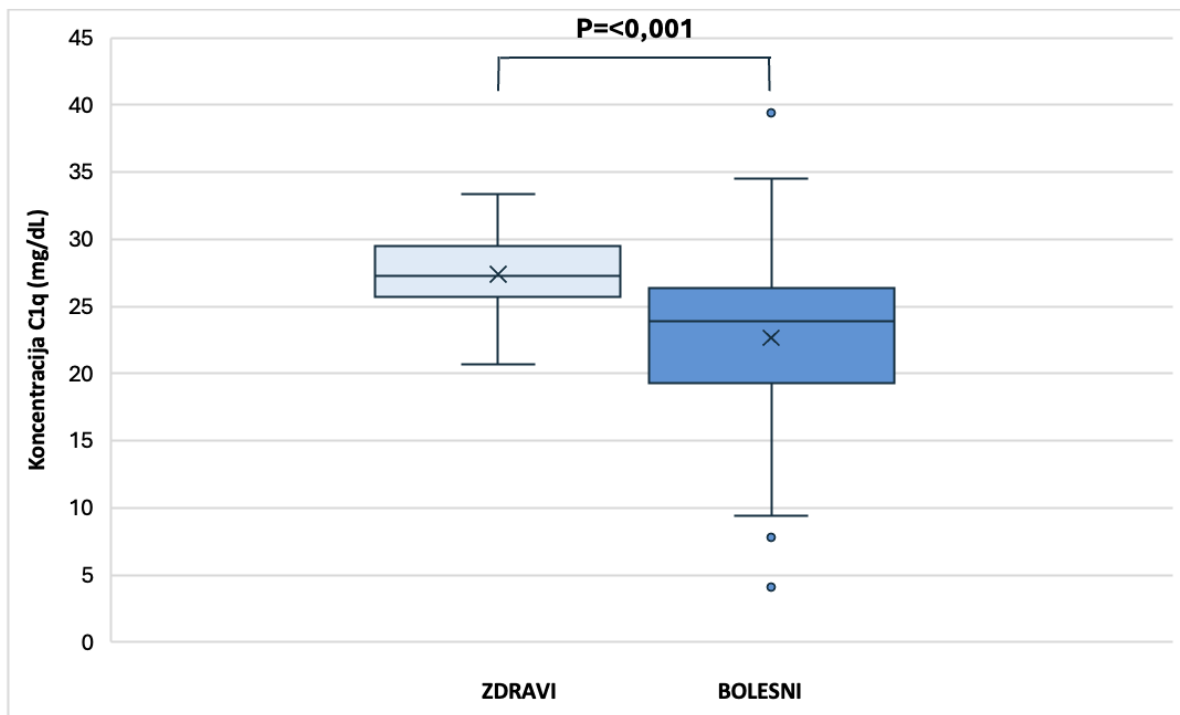
Tablica 3. Deskriptivna statistika dobivenih koncentracija C1q u serumu zdravih ispitanika

PARAMETAR	ZDRAVI ISPITANICI		
	MUŠKI (N=14)	ŽENSKI (N=19)	UKUPNO (N=33)
Srednja vrijednost	27,5	27,4	27,4
Standardna devijacija	3,1	3,2	3,1
Koeficijent varijabilnosti	11,1	11,7	11,3
Varijanca	9,3	10,3	9,6
Srednja pogreška srednje vrijednosti	0,8	0,7	0,5
Najniža vrijednost	22,0	20,7	20,7
Najviša vrijednost	31,9	33,4	33,4
Medijan	27,3	27,4	27,3

#### 4.2. OPĆE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA S DIJAGNOZOM SLE

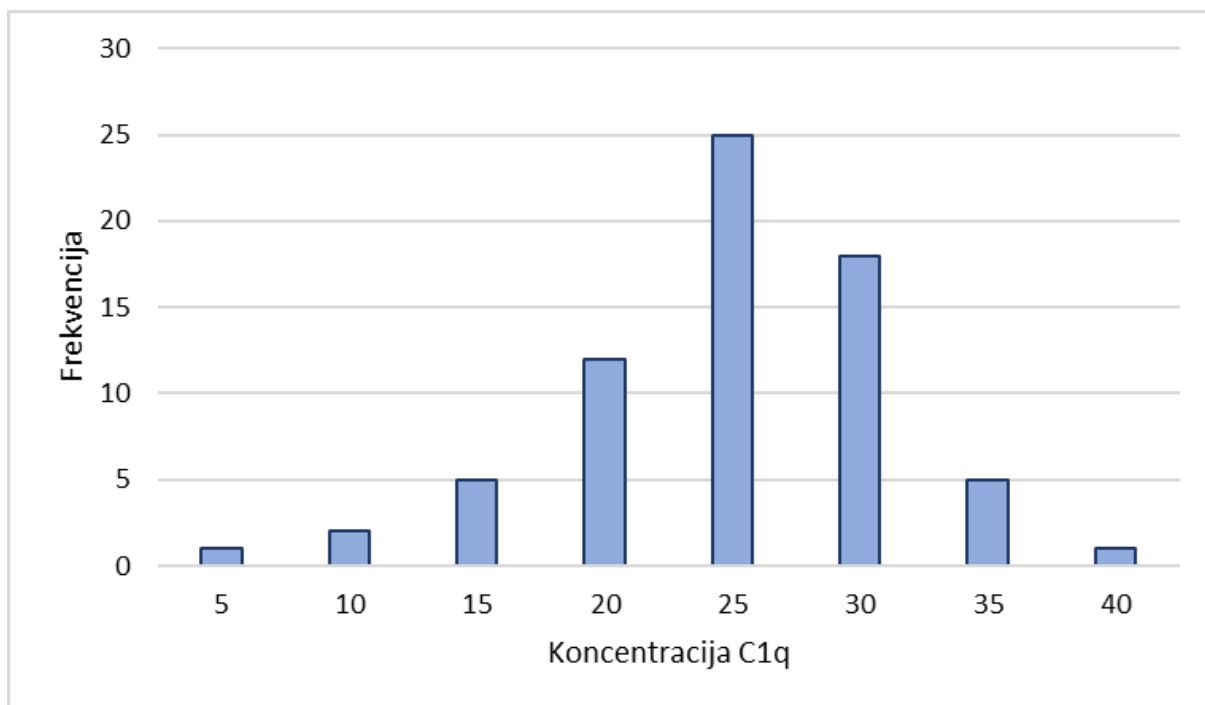
Koncentracija C1q određena je u serumu 68 ispitanika s dijagnozom SLE, od kojih su 9 bili muškarci, dok su 59 bile žene. Omjer žena i muškaraca iznosio je 6,56. Srednja vrijednost koncentracije C1q u serumu iznosila je 22,7 mg/dL, pri čemu je srednja vrijednost serumske koncentracije C1q kod muških ispitanika bila nešto viša (24,0 mg/dL) u odnosu na srednju vrijednost dobivenu u ženskih ispitanika (22,5 mg/dL).

Shapiro – Wilk-ovim testom je utvrđena normalna razdioba rezultata C1q. Dobivena je statistički značajna razlika koncentracija C1q između zdravih i bolesnih ispitanika ( $P=<0,001$ ), kako je prikazano na Slici 7.



Slika 7. Vrijednosti C1q u zdravih i bolesnih ispitanika

Na Slici 8. prikazan je histogram frekvencija izmjerenih koncentracija C1q u serumu bolesnih ispitanika.



Slika 8. Histogram frekvencija koncentracije C1q u serumu bolesnih ispitanika

U Tablici 4. prikazana je deskriptivna statistika rezultata izmjerenih koncentracija C1q u serumu 68 bolesnih ispitanika te rezultati dobiveni nakon podjele bolesnih ispitanika prema spolu.

Tablica 4. Deskriptivna statistika koncentracije C1q u serumu bolesnih ispitanika

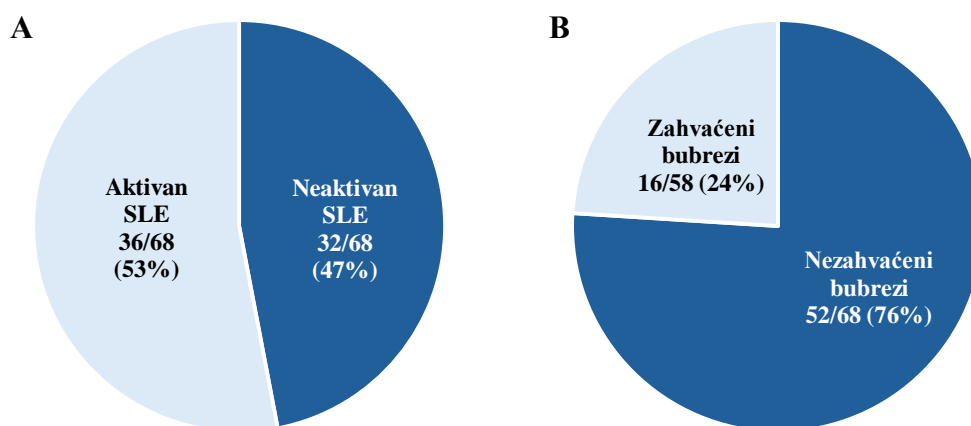
PARAMETAR	BOLESNI ISPITANICI		
	MUŠKI (N=9)	ŽENSKI (N=59)	UKUPNO (N=68)
<b>Srednja vrijednost</b>	24,0	22,5	22,7
<b>Standardna devijacija</b>	5,1	6,5	6,3
<b>Koeficijent varijabilnosti</b>	21,2	29,0	27,9
<b>Varijanca</b>	25,8	42,4	40,0
<b>Srednja pogreška srednje vrijednosti</b>	1,7	0,9	0,8
<b>Najniža vrijednost</b>	16,2	4,1	4,1
<b>Najviša vrijednost</b>	32,1	39,4	39,4
<b>Medijan</b>	24,7	23,7	23,9

Iako je dobivena srednja vrijednosti C1q bila nešto niža kod žena u odnosu na muškarce nije utvrđena statistički značajna razlika vrijednosti koncentracija C1q dobivenih u serumu muških i ženskih bolesnih ispitanika ( $P=0,511$ ).

#### 4.3. AKTIVNOST SLE I ZAHVAĆENOST BUBREGA

U suradnji s kliničarima Zavoda za kliničku imunologiju i reumatologiju KBC-a Zagreb, ispitanici s dijagnozom SLE su podijeljeni u skupine prema aktivnosti bolesti i s obzirom na zahvaćenost bubrega.

Na Slici 9. je prikazan udio ispitanika s obzirom na aktivnost bolesti te s obzirom na zahvaćenost bubrega.



Slika 9. Udio bolesnih ispitanika s obzirom na aktivnost sistemskog eritemskog lupusa (SLE) (slika A) te s obzirom na zahvaćenost bubrega (slika B)

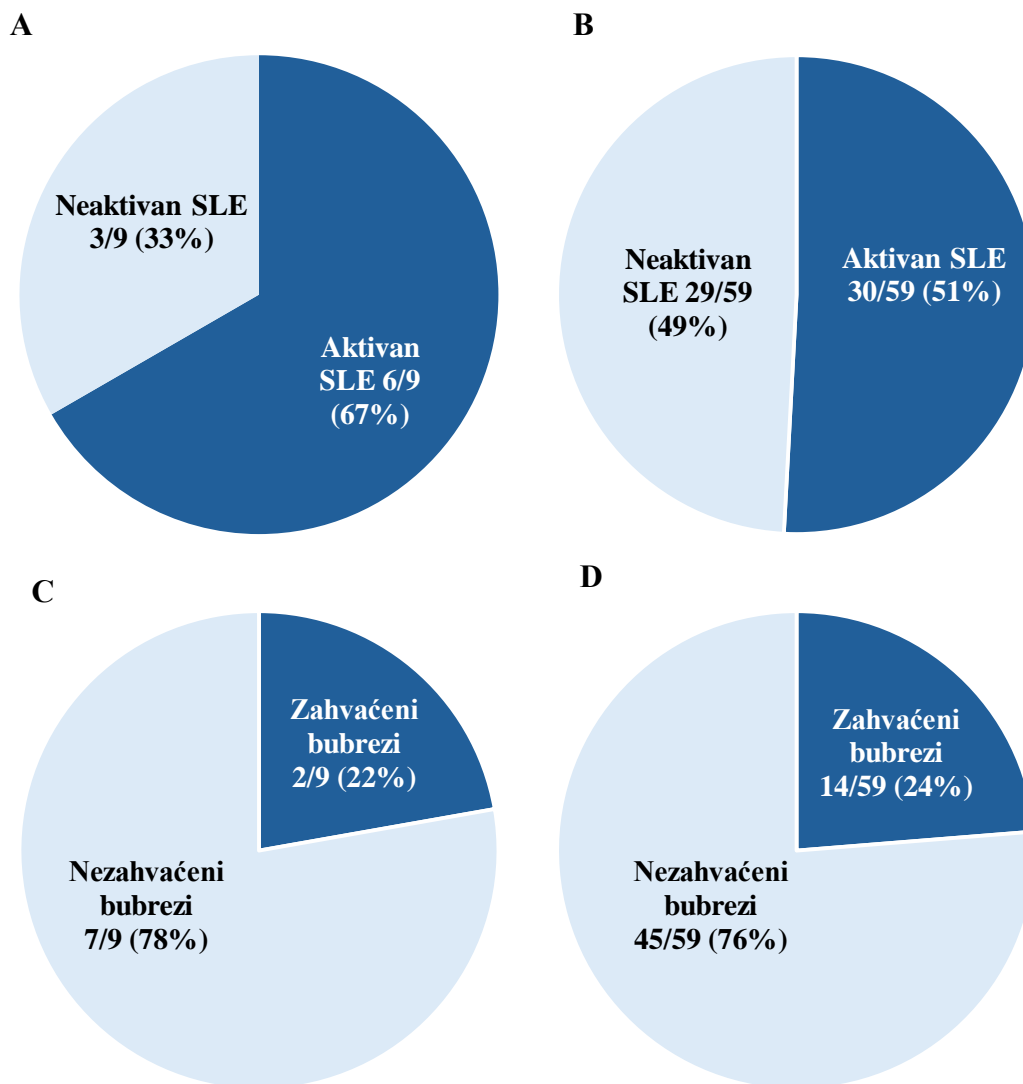
U Tablici 5. je prikazana deskriptivna statistika dobivenih rezultata mjerenja koncentracije C1q u serumu ispitanika podijeljenih u skupine prema statusu SLE na skupinu s aktivnom i neaktivnom bolesti te prema zahvaćenosti bubrega na skupinu sa zahvaćenim i nezahvaćenim bubrezima.

Tablica 5. Deskriptivna statistika rezultata koncentracije C1q u serumu bolesnih ispitanika s obzirom na aktivnost sistemskog eritemskog lupusa i zahvaćenost bubrega

PARAMETAR	SISTEMSKI ERITEMSKI LUPUS		ZAHVAĆENOST BUBREGA	
	Aktivan (N=36)	Neaktivan (N=32)	DA (N=16)	NE (N=52)
Srednja vrijednost	22,2	23,2	21,1	23,2
Standardna devijacija	7,2	5,3	5,3	6,6
Koeficijent varijabilnosti	32,3	22,8	25,3	28,4
Varijanca	51,1	28,2	28,6	43,2
Srednja pogreška srednje vrijednosti	1,2	0,9	1,3	0,9
Najniža vrijednost	4,1	10,8	9,5	4,1
Najviša vrijednost	39,4	32,1	31,5	39,4
Medijan	23,3	24,6	21,1	24,6

Shapiro – Wilk-ovim testom je utvrđena normalna razdioba rezultata. Nije utvrđena statistički značajna razlika između bolesnih ispitanika s aktivnim u odnosu na neaktivni SLE ( $P=0,487$ ) i bolesnih ispitanika sa zahvaćenim bubrezima u odnosu na ispitanike kod kojih nisu bili zahvaćeni bubrezi ( $P=0,269$ ).

Na slici 10. prikazana je raspodjela aktivnosti SLE te zahvaćenosti bubrega u oboljelih ispitanika s obzirom na spol.



Slika 10. Udio muških (slika A) te ženskih (slika B) ispitanika s obzirom na aktivnost sistemskog eritemskog lupusa (SLE) i udio muških (slika C) te ženskih ispitanika (slika D) s obzirom na zahvaćenost bubrega

U Tablici 6. je prikazan broj ispitanika s obzirom na istodobnu aktivnost bolesti te zahvaćenost bubrega.

Tablica 6. Raspodjela bolesnih ispitanika prema aktivnosti sistemskog eritemskog lupusa (SLE) i zahvaćenosti bubrega.

	<b>Zahvaćenost bubrega</b>	<b>Nezahvaćenost bubrega</b>	<b>Ukupno</b>
<b>Aktivan SLE</b>	12	24	36
<b>Neaktivan SLE</b>	4	28	32
<b>Ukupno</b>	<b>16</b>	<b>52</b>	<b>68</b>

Tablica 7. prikazuje deskriptivnu statistiku ispitanika koji su istodobno imali aktivnu/neaktivnu bolest uz zahvaćene/nezahvaćene bubrege, a kako je prikazano u Tablici 6.

Tablica 7. Deskriptivna statistika koncentracije C1q u serumu ispitanika sa sistemskim eritemskim lupusom (SLE) koji su istodobno imali aktivnu /neaktivnu bolest uz zahvaćenost/nezahvaćenost bubrega

<b>PARAMETAR</b>	<b>Aktivan SLE uz zahvaćenost bubrega (N=12)</b>	<b>Aktivan SLE bez zahvaćenosti bubrega (N=24)</b>	<b>Neaktivan SLE uz zahvaćenost bubrega (N=4)</b>	<b>Neaktivan SLE bez zahvaćenosti bubrega (N=28)</b>
<b>Srednja vrijednost</b>	21,0	22,8	21,6	23,5
<b>Standardna devijacija</b>	5,5	7,9	5,8	5,3
<b>Koeficijent varijabilnosti</b>	26,0	34,7	26,7	22,6
<b>Varijanca</b>	29,8	62,4	33,3	28,2
<b>Srednja pogreška srednje vrijednosti</b>	1,6	1,6	2,9	1,0
<b>Najniža vrijednost</b>	9,5	4,1	14,6	10,8
<b>Najviša vrijednost</b>	31,5	39,4	26,5	32,1
<b>Medijan</b>	21,1	24,3	22,7	24,6

Analizom ANOVA nisu utvrđene statistički značajne razlike koncentracija C1q u serumu između skupina podijeljenih prema Tablici 7.

U Tablici 8. prikazana je deskriptivna statistika rezultata koncentracije C3 u serumu bolesnih ispitanika s obzirom na aktivnost SLE i zahvaćenost bubrega. Utvrđena je statistički značajna razlika t-testom između skupina s aktivnim i neaktivnim SLE (**P=0,002**). Za razliku od toga nije dobivena statistički značajna razlika između skupina bolesnika sa zahvaćenim i nezahvaćenim bubrezima (P=0,232).

Tablica 8. Deskriptivna statistika rezultata koncentracije C3 u serumu bolesnih ispitanika s obzirom na aktivnost sistemskog eritemskog lupusa (SLE) i zahvaćenost bubrega

PARAMETAR	SISTEMSKI ERITEMSKI LUPUS		ZAHVAĆENOST BUBREGA		UKUPNO (N=68)
	Aktivan (N=36)	Neaktivan (N=32)	DA (N=16)	NE (N=52)	
Srednja vrijednost	0,79	1,03*	0,84	0,92	0,90
Standardna devijacija	0,26	0,33	0,22	0,34	0,31
Koeficijent varijabilnosti	32,41	31,72	25,70	36,46	34,66
Varijanca	0,066	0,107	0,046	0,114	0,098
Srednja pogreška srednje vrijednosti	0,04	0,06	0,05	0,05	0,04
Najniža vrijednost	0,23	0,46	0,48	0,23	0,23
Najviša vrijednost	1,54	1,79	1,1	1,79	1,79
Medijan	0,80	0,96	0,91	0,87	0,88

\*statistički značajna razlika

U Tablici 9. prikazana je deskriptivna statistika rezultata koncentracije C4 u serumu bolesnih ispitanika s obzirom na aktivnost SLE i zahvaćenost bubrega pri čemu je t-testom utvrđena statistički značajna razlika između skupina s aktivnim i neaktivnim SLE (**P=0,004**) dok između

skupina sa zahvaćenim i nezahvaćenim bubrezima statistički značajna razlika nije utvrđena (P=0,491).

Tablica 9. Deskriptivna statistika rezultata koncentracije C4 u serumu bolesnih ispitanika s obzirom na aktivnost sistemskog eritemskog lupusa (SLE) i zahvaćenost bubrega

PARAMETAR	SISTEMSKI ERITEMSKI LUPUS		ZAHVAĆENOST BUBREGA		UKUPNO (N=68)
	Aktivan (N=36)	Neaktivan (N=32)	DA (N=16)	NE (N=52)	
Srednja vrijednost	0,11	0,17*	0,13	0,14	0,14
Standardna devijacija	0,07	0,09	0,06	0,09	0,08
Koeficijent varijabilnosti	58,89	52,46	48,46	61,66	59,14
Varijanca	0,004	0,008	0,004	0,008	0,007
Srednja pogreška srednje vrijednosti	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01
Najniža vrijednost	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03
Najviša vrijednost	0,29	0,35	0,22	0,35	0,35
Medijan	0,10	0,15	0,12	0,14	0,12

\*statistički značajna razlika

U Tablici 10. su prikazani rezultati analize korelacija između koncentracije C1q i koncentracije C3 i C4 u serumima bolesnih ispitanika. Analizom su utvrđene statistički značajne korelacije između koncentracija C1q i C3 (P=<0,001), C1q i C4 (P=<0,001) i C3 i C4 (P<0,001).

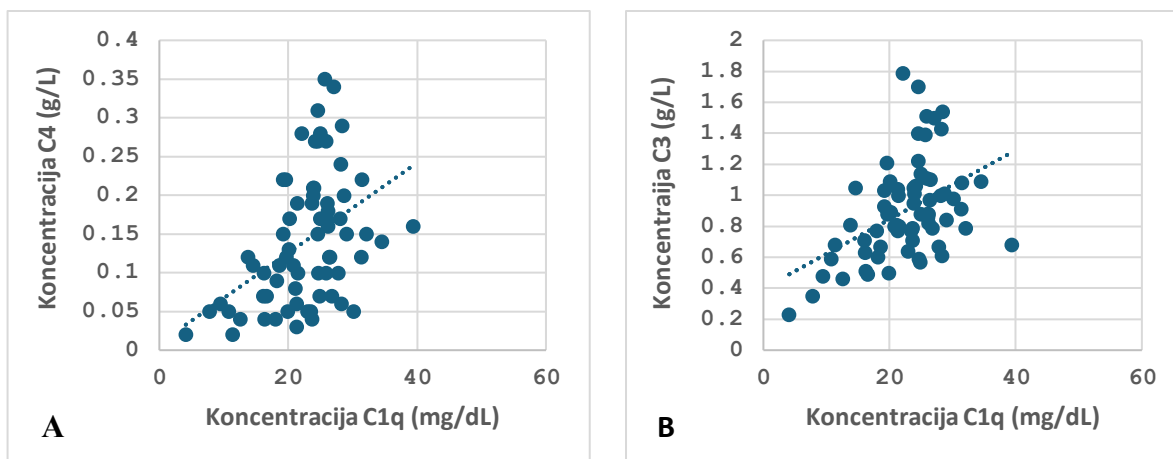
Tablica 10. Korelacija između koncentracije C1q i koncentracije C3 i C4 u serumima bolesnih ispitanika

PARAMETAR	C1q	C3	C4
C1q	1	/	/
C3	r=0,450; P=<0,001	1	/
C4	ρ=0,460; P=<0,001	ρ=0,771; P=<0,001	1

r=Pearsonov koeficijent korelacije; ρ=Spearmanov koeficijent korelacije



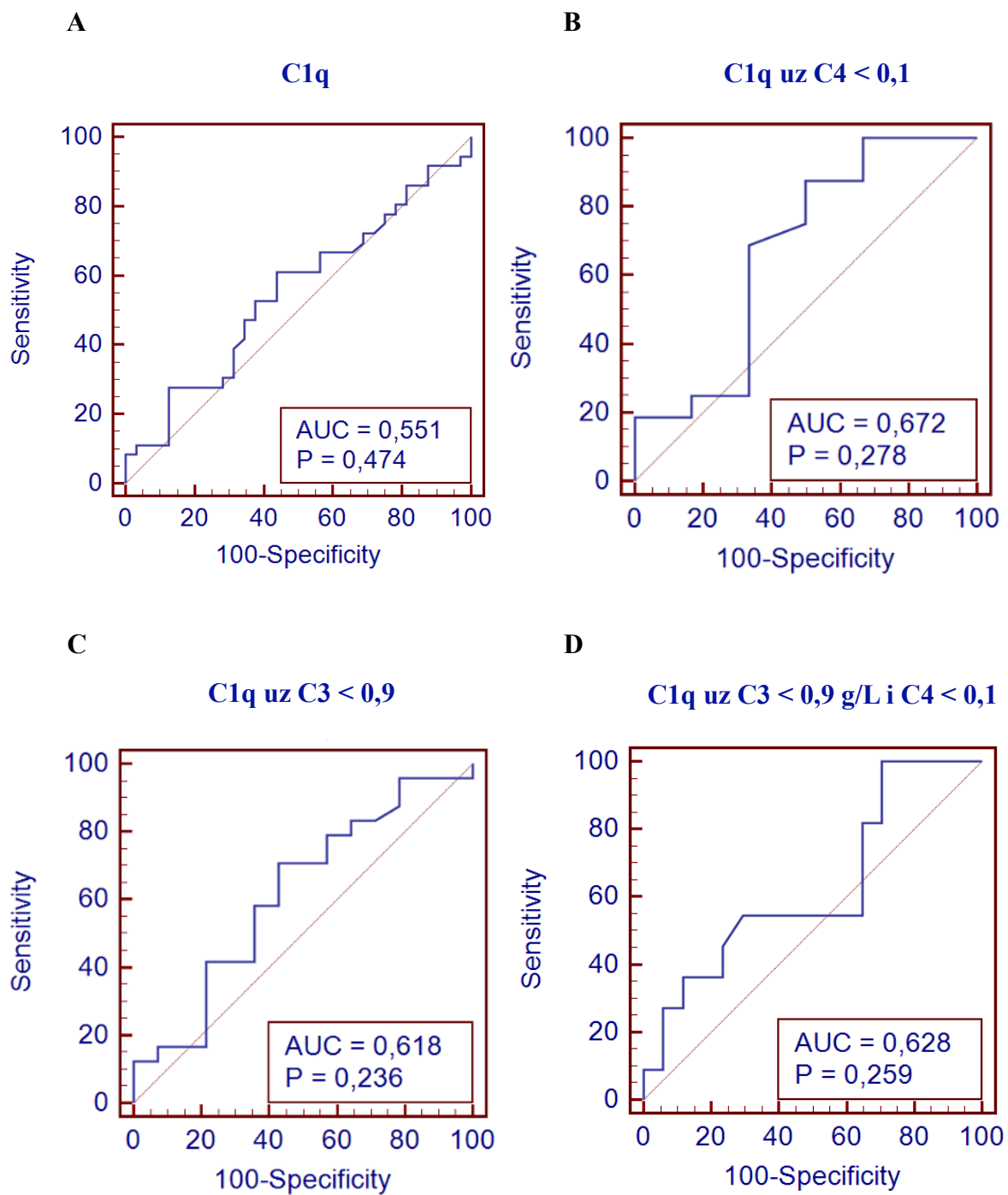
Slika 11. predstavlja grafički prikaz linearnih korelacija između koncentracije C1q i koncentracije C4 te koncentracije C1q i koncentracije C3 u serumu bolesnih ispitanika.



Slika 11. Grafički prikaz linearnih korelacija između koncentracije C1q i koncentracije C4 (Slika A) te između koncentracije C1q i koncentracije C3 (Slika B).

#### 4.4. KRIVULJE OPERATIVNIH KARAKTERISTIKA

Na Slici 12. prikazane su krivulje operativnih karaktersitika (engl. *Receiver operating characteristic*, ROC) za C1q kao potencijalnog biomarkera aktivnosti SLE. Uz vrijednost koncentracije C1q kao filteri su korištene vrijednosti C3 i C4. Kao prvi filter primijenjena je koncentracija C4 manja od 0,1 g/L dok je drugi filter bila koncentracija C3 manja od 0,9 g/L. Kao posljednji filter istodobno su primijenjene koncnetracija  $C4 < 0,1$  g/L i koncentracija  $C3 < 0,9$  g/L. U Tablici 11. prikazani su Youdenovi indeksi (J) i pridruženi kriteriji, te osjetljivost i specifičnost za ROC krivulje prikazane na slici 12.



Slika 12. Krivulje operativnih karaktersitika za C1q kao potencijalnog biomarkera aktivnosti sistemskog eritemskog lupusa

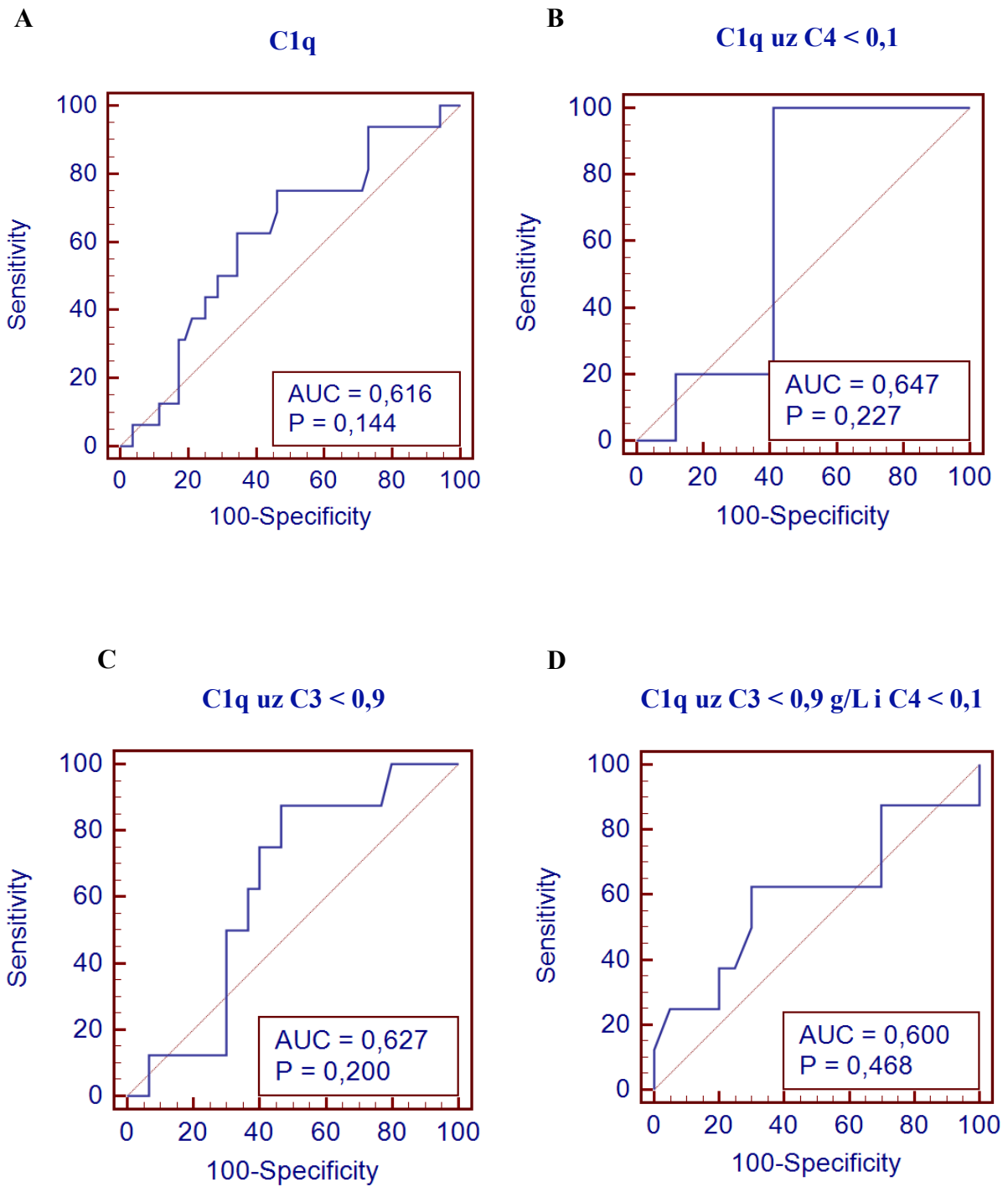
Tablica 11. Prikaz Youden indeks, pridruženih kriterija, osjetljivosti i specifičnosti ROC krivulja sa Slike 12.

ROC krivulja	Youden indeks (J)	Pridruženi kriterij	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
<b>C1q</b>	0,174	≤ 24,0	61,1	56,3
<b>C1q uz C4 &lt; 0,1 g/L</b>	0,375	≤ 23,5	87,5	50,0
<b>C1q uz C3 &lt; 0,9 g/L</b>	0,280	≤ 23,5	70,8	57,1
<b>C1q uz C3 &lt; 0,9 g/L i C4 &lt; 0,1 g/L</b>	0,294	≤ 20,1	100,0	29,4

Na Slici 13. su prikazane ROC krivulje za C1q kao potencijalnog biomarkera za zahvaćenost bubrega. Uz vrijednost koncentracije C1q korištene su kao filteri koncentracije C3 i C4. Kao prvi filter primijenjena je koncentracija C4 < 0,1 g/L dok je drugi filter bila koncentracija C3 < 0,9 g/L. Kao posljednji filter primijenjene su i koncentracija C4 < 0,1 g/L i koncentracija C3 < 0,9 g/L. U Tablici 12. prikazani su Youdenovi indeksi (J) i pridruženi kriteriji, te osjetljivost i specifičnost za ROC krivulje prikazane na slici 13.

Tablica 12. Prikaz Youden indeksa, pridruženih kriterija, osjetljivosti i specifičnosti ROC krivulja sa Slike 13.

ROC krivulja	Youden indeks (J)	Pridruženi kriterij	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
<b>C1q</b>	0,289	≤ 24,0	75,0	53,9
<b>C1q uz C4 &lt; 0,1 g/L</b>	0,588	≤ 19,9	100,0	58,8
<b>C1q uz C3 &lt; 0,9 g/L</b>	0,408	≤ 21,5	87,5	53,3
<b>C1q uz C3 &lt; 0,9 g/L i C4 &lt; 0,1 g/L</b>	0,325	≤ 24,0	62,5	70,0



Slika 13. Krivulje operativnih karaktersitika za C1q kao potencijalnog biomarkera za zahvaćenost bubrega

#### 4.5. PODJELA U SKUPINE PREMA REFERENTNIM INTERVALIMA

U Tablici 13. prikazana je raspodjela bolesnih ispitanika u četiri skupine svrstanih prema izmjerenim koncentracijama C1q. Granice skupina su određene temeljem vrijednosti referentnog intervala predloženom od proizvođača reagensa TRIMERO Diagnostics (Španjolska) koji je od 15,7 do 30,6 mg/dL.

Tablica 13. Raspodjela bolesnih ispitanika prema vrijednostima referentnog intervala koncentracije C1q predloženim od proizvođača reagensa

PARAMETAR	Koncentracija C1q			
	< 15,7 mg/dL	15,7 - 23,0 mg/dL	23,1 - 30,6 mg/dL	> 30,6 mg/dL
<b>Broj ispitanika unutar skupine (N)</b>	8	22	33	5
<b>Medijan C1q (mg/dl)</b>	11,1	19,8	25,9	32,1
<b>Medijan C4 (g/L)</b>	0,05	0,10	0,17	0,15
<b>Medijan C3 (g/L)</b>	0,54	0,80	0,98	0,91
<b>C4 ≤ 0,1 g/L (n/N%)</b>	6 (75%)	12 (55%)	9 (27%)	0 (0%)
<b>C3 ≤ 0,9 g/L (n/N%)</b>	7 (88%)	15 (68%)	14 (42%)	2 (40%)
<b>Aktivan SLE (n/N%)</b>	4 (50%)	14 (64%)	15 (45%)	3 (60%)
<b>Zahvaćeni bubrezi (n/N%)</b>	2 (25%)	8 (36%)	5 (15%)	1 (20%)

U Tablici 14. je prikazana raspodjela bolesnih ispitanika u četiri skupine svrstanih prema izmjerenim koncentracijama C1q. Granice skupina su određene temeljem referentnog intervala Izračunatog iz koncentracija C1q određenih serumu 33 zdrava ispitanika. Izračunati referentni interval iznosio je 20,7 do 33,4 mg/dL.

Tablica 14. Raspodjela bolesnih ispitanika temeljem referentnog intervala koncentracije C1q izračunatog na zdravim ispitanicima.

PARAMETAR	Koncentracija C1q			
	< 20,7 mg/dL	20,7 – 27,0 mg/dL	27,1 – 33,4 mg/dL	> 33,4 mg/dL
<b>Broj ispitanika unutar skupine (N)</b>	22	32	12	2
<b>Medijan C1q (mg/dl)</b>	16,5	24,6	28,6	37,0
<b>Medijan C4 (g/L)</b>	0,08	0,17	0,16	0,15
<b>Medijan C3 (g/L)</b>	0,68	0,92	0,99	0,89
<b>C4 ≤0,1 g/L (n/N%)</b>	13 (59%)	11 (34%)	3 (25%)	0 (0%)
<b>C3 ≤0,9 g/L (n/N%)</b>	17 (77%)	16 (50%)	4 (33%)	1 (50%)
<b>Aktivan SLE (n/N%)</b>	12 (55%)	17 (53%)	5 (42%)	2 (100%)
<b>Zahvaćeni bubrezi (n/N%)</b>	7 (32%)	8 (25%)	1 (8%)	0 (0%)

## 5. RASPRAVA

SLE je složena multisistemska autoimuna bolest koju karakterizira izmjenjujuće faze remisije i relapsa bolesti. Najčešća i najteža komplikacija SLE-a je lupusni nefritis (LN) koji predstavlja poseban oblik glomerulonefritisa uzrokovan nastankom i taloženjem imunokompleksa. Brojna su istraživanja usmjerena na otkrivanje novih biomarkera za SLE i LN. S obzirom na to da se autoantitijela i upalni citokini javljaju u povišenim koncentracijama čak godinama prije dijagnoze SLE, pretpostavka je kako slično načelo vrijedi i za LN. Kao potencijalni ciljni biljezi proučavani su serumska autoantitijela, citokini i kemokini u serumu i urinu, molekule stanične adhezije, miRNA, molekule komplementa, drugi proteini i lipidi te genetski biljezi kao i epigenetski utjecaj. Međutim, složena patogeneza ove bolesti otežava razvoj novih biomarkera te se unatoč tome u praksi koriste isti biomarkeri već posljednjih tri desetljeća (Morales i sur. 2021.). Slijedom navedenog, cilj ovog istraživanja bio je ispitati potencijalnu korisnost vrijednosti koncentracije komponente komplementa C1q, uz redovno korištene C3 i C4, kao biomarkera za SLE i aktivnost LN.

Prema našem saznanju, ovo je prvo istraživanje u kojem su izmjerene koncentracije komponente komplementa C1q u zdravoj odrasloj populaciji Republike Hrvatske, s ciljem utvrđivanja referentnog intervala. Izračunata srednja vrijednost koncentracije C1q iznosila je 27,4 mg/dL, te je na temelju izmjerenih vrijednosti u našoj zdravoj odrasloj populaciji utvrđen referentni interval 20,7 - 33,4 mg/dL. Dobiveni referentni interval se razlikuje od dostupnih literaturnih podataka koje su prikazane u Tablici 15.

Tablica 15. Prikaz objavljenih srednjih vrijednosti koncentracija C1q i referentnih intervala

<b>IZVOR</b>	<b>METODA</b>	<b>KONCENTRACIJA C1q (mg/dL)</b>	<b>BROJ ISPITANIKA</b>	<b>GEOGRAFSKO PODRUČJE</b>
Tan i sur. (2013.)	ELISA	6,2 ± 1,1	22	Kina
Sandholm i sur. (2019.)	MBSI	7,6 - 26,4*	100	Švedska
Xu i sur. (2019.)	Turbidimetrija	18,3 ± 2,9	497	Kina
Trimerio Diagnostics	Nefelometrija	15,7 - 30,6*	90	Španjolska

ELISA: enzimska imunokemijska analiza na čvrstom nosaču; MBS: imunokemijska „sendvič“ metoda s magnetskim kuglicama ; \*Referentni intervali

Nepodudarnosti srednjih vrijednosti, odnosno referentnih intervala mogu biti posljedica primjene različitih analitičkih metoda, broja ispitanika te geografskog područja obuhvaćenog

istraživanjem. Sandholm i sur. (2019.) su uočili značajnu korelaciju između metode raketne imunoelktroforeze (engl. *rocket immune electrophoresis*, RIE) i metode enzimske imunokemijske analize na čvrstom nosaču (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) kao i RIE s imunokemijskom „sendvič“ metodom s magnetskim kuglicama (engl. *Magnetic Bead Sandwich Immunoassay*, MBSI) dok nefelometrija nije korelirala ni s RIE-om niti s MBSI. Kao razloge izostanka korelacije autori navode drugačije omjere antigena i antitijela u samim testovima te osjetljivost nefelometrije na prisutnost anti-C1q antitijela. Iz funkcije komponente komplementa C1q proizlazi afinitet prema imunokompleksima koji sadrže antitijela klasa IgG i IgM kada su ona prisutna u suvišku. U izravnim imunokemijskim metodama u otopini, poput turbidimetrije i nefelometrije, zona ekvivalencije pomaknuta je bliže suvišku antitijela dok metode poput RIE i MBSI koriste omjere antigena i antitijela koje su bliže suvišku antigena. Također je uočeno kako prisutnost anti-C1q antitijela nije utjecala na rezultate RIE i MBSI, dok je kod nefelometrijske metode postojala interferencija. (Sandholm i sur., 2019.). Proizvođač reagensa korištenih u ovome istraživanju ne navodi anti-C1q antitijela kao potencijalnu interferenciju niti je kod bolesnih ispitanika u ovom istraživanju ispitana prisutnost ovih antitijela. Prema provedenim istraživanjima, u osoba oboljelih od SLE utvrđena je prevalencija anti-C1q antitijela u rasponu od 28% do 60%, dok je u osoba s aktivnim LN utvrđena prevalencija od 74% do 97% (Stojan i Petri, 2016.). S obzirom na opisanu visoku prevalenciju anti-C1q antitijela kao i njihovu potencijalnu interferenciju s nefelometrijskom metodom, od velike je važnosti u daljnjim istraživanjima utvrditi postojanje interferencije i njen potencijalni utjecaj.

Određivanje serumskih koncentracija C1q u zdravih i bolesnih ispitanika omogućuje usporedbu izmjerenih vrijednosti. Utvrđena je statistički značajna razlika koncentracija C1q između ispitanika ( $P < 0,001$ ), pri čemu je koncentracija C1q zdravih ispitanika  $27,4 \pm 3,1$  mg/dL, a bolesnih ispitanika  $22,7 \pm 6,3$  mg/dL. Snižene koncentracije C1q u bolesnih u odnosu na zdrave ispitanike utvrđena je i u drugim istraživanjima, bez obzira na razlike u analitičkim metodama i broju ispitanika (Tan i sur., 2013.; Sandholm i sur., 2019.; Xu i sur., 2019.). Dobivene statistički značajno snižene koncentracije C1q u bolesnih ispitanika u odnosu na zdrave ispitanike bila je očekivana, te je služila kao daljnji poticaj za ispitavanje korisnosti određivanja koncentracije komponente komplementa C1q kao biomarkera SLE i LN.

Ispitanici sa SLE su dodatno podijeljeni u četiri skupine s obzirom na aktivnost bolesti (aktivni i neaktivni SLE) i na zahvaćenost bubrega (zahvaćeni i nezahvaćeni bubrezi) te su dobivene koncentracije C1q uspoređene između skupina (Tablica 5). Iako je srednja vrijednost koncentracije C1q bila nešto niža u bolesnih ispitanika s aktivnim SLE u odnosu na bolesnike



s neaktivnim SLE nije utvrđena statistički značajna razlika koncentracija C1q. Slično tome nije utvrđena statistički značajna razlika koncentracija C1q između bolesnika sa zahvaćenim i nezahvaćenim bubrezima, iako je srednja vrijednost koncentracije C1q bila nešto niža u bolesnika sa zahvaćenim bubrezima u odnosu na one bez zahvaćenih bubrega. Ispitivanjem koncentracija C1q između bolesnih ispitanika s aktivnim SLE i sa zahvaćenim bubrezima također nije utvrđena statistički značajna razlika. Suprotno od dobivenih rezultata u ovom istraživanju, Xu i sur. (2019) su utvrdili statistički značajnu razliku između ispitanika sa zahvaćenim i nezahvaćenim bubrezima te između ispitanika s aktivnim SLE i zahvaćenim bubrezima. SLE i LN su vrlo varijabilne bolesti s obzirom na izražaj bolesti i odgovor na terapiju. Budući da je u ovome istraživanju broj ispitanika značajno manji od broja ispitanika u drugim istraživanjima, vjerojatan je veći utjecaj interindividualnih razlika, te bi u daljnjem istraživanju bilo poželjno dopuniti istraživanje uključivanjem većeg broja ispitanika sa SLE. Bolesni su ispitanici nadalje podjeljeni u skupine na temelju istodobne aktivnosti SLE i zahvaćenosti bubrega (Tablica 6.) te iako analizom varijance nisu utvrđene statistički značajne razlike između skupina, utvrđeno je postojnje trenda nižih koncentracija C1q u skupini bolesnika s aktivnim SLE i zahvaćenih bubrega u odnosu na skupinu bolesnika s aktivnim SLE i nezahvaćenih bubrega kao i trend nižih koncentracija C1q u odnosu na preostale istraživane skupine (Tablica 7.). Slični rezultati dobiveni su u istraživanju Sandholm i sur. (2019.) koji su utvrdili statistički značajnu razliku između bolesnika s aktivnim SLE i zahvaćenim bubrezima te bolesnika s aktivnim SLE bez zahvaćenosti bubrega, pri čemu je skupina s aktivnim SLE i zahvaćenim bubrezima imala najnižu koncentraciju C1q u odnosu na ostale skupine. Sličnost se očituje i u srednjoj vrijednosti koncentracije C1q, pri čemu je medijan skupine s aktivnim SLE i zahvaćenim bubrezima u našem istraživanju iznosio 21,1 mg/dL, dok su Sandholm i sur. (2019.) u istoj skupini utvrdili vrijednost od 19,4 mg/dL. Izostanak statistički značajnih razlika u ovome istraživanju može se objasniti činjenicom da su Sandholm i sur. koristili MBSI metodu koja je pokazala nisku korelaciju s nefelometrijskom metodom ( $r=0,430$ ). Važno je istaknuti i kako se nefelometrijska metoda korištena u radu Sandholm i sur. (2019.) razlikuje od nefelometrijske metode korištene u ovome istraživanju i s obzirom na analizator na kojemu su mjerenja provedena i s obzirom na sastav reagensa.

Podjelom bolesnika u četiri skupine s aktivnim i neaktivnim SLE te zahvaćenim i nezahvaćenim bubrezima, čije su vrijednosti koncentracija C3 (Tablica 8.) i C4 (Tablica 9.) uspoređene. Utvrđene su statistički značajno niže koncentracije C3 (**P=0,002**) i C4 (**P=0,004**) u skupini ispitanika s aktivnim SLE u odnosu na ispitanike s neaktivnim SLE. Također je utvrđena statistički značajna korelacija između koncentracije komponente komplementa C1q i

koncentracija komponenti komplementa C3 i C4 (Slika 11.) Dobiveni statistički značajni rezultati podudarni su s dosadašnjim spoznajama o aktivnosti sustava komplementa tijekom aktivnog SLE. Naime, poznato je kako tijekom bolesti dolazi do prekomjerne aktivacije sustava komplementa koja se očituje smanjenjem serumskih koncentracija C3 i C4 (Weinstein i sur. 2021.; Satyam i sur. 2022.). Chi i suradnici (2015) su utvrdili negativnu korelaciju komponenti komplementa C3 i C4 s antitijelom anti-C1q, što također odgovara ovdje opaženim rezultatima. Potrebno je naglasiti kako je za potrebe ovog istraživanja zanemaren učinak imunosupresivne terapije za koju je poznat utjecaj na koncentraciju komponente komplementa C3 (Satyam i sur., 2022.). S obzirom na utvrđenu korelaciju koncentracije komponente komplementa C1q s koncentracijama komponenti komplementa C3 i C4, ispitana je upotreba donjih granica referentnih intervala za komponente komplementa C3 i C4 kao filter u sklopu ROC analize.

Kako bi se ispitala korisnost vrijednosti koncentracije komponente komplementa C1q kao potencijalnog biomarkera za dijagnozu SLE i LN napravljena je analiza krivulja operativnih karakteristika. S obzirom na značaj koncentracija komponentata komplementa C3 i C4, kao filter su korištene njihove vrijednosti niže od donjih granica referentnih intervala. ROC analiza uključuje izračun površine ispod krivulje (engl. *area under the curve*, AUC), pri čemu se sve vrijednosti AUC više od 0,800 smatraju prihvatljivima za potencijalni biomarker (Nahm, 2022.). Usporedbom vrijednosti AUC dobivenih za ROC krivulje kod ispitivanja C1q kao potencijalnog biomarkera za aktivnost SLE uz filtere C3 i C4 (Slika 12.), najniža vrijednost površine ispod krivulje (AUC=0,551; J=0,174; pridružen kriterij=  $\leq 24$  mg/dL) je zabilježena kad nije korišten niti jedan filter, dok je najviša vrijednost (AUC=0,672; J=0,375; pridružen kriterij=  $\leq 23,5$  mg/dL) zabilježena ako je kao filter korištena koncentracija C4  $< 0,19$  g/L kao filterom.

Dodatna ROC analiza je napravljena za ispitivanje C1q kao potencijalnog biomarkera za zahvaćenost bubrega uz filtere C3 i C4 (Slika 13.). Najniža vrijednost površine ispod krivulje (AUC=0,600; J=0,325, pridružen kriterij=  $\leq 24$  mg/dL) dobivena je ukoliko su kao filter korištene koncentracije C3  $< 0,9$  g/L i C4  $< 0,1$  g/L, dok je najviša vrijednost (AUC=0,647; J=0,588, pridružen kriterij=  $\leq 19,9$  mg/dL) dobivena kad je kao filter korištena koncentracija C4  $< 0,1$  g/L. U slučaju ispitivanja komponente komplementa C1q kao potencijalnog biomarkera za aktivnost SLE i zahvaćenost bubrega, kao najbolja vrijednost filtera se pokazala koncentracija komponente C4  $< 0,1$  g/L. Mogući razlog prednosti komponente C4 nad C3 je ranije spomenuta podložnost koncentracije komponente C3 na utjecaj imunosupresivne terapije (Chi i sur., 2015.)

Kako niti jedna dobivena vrijednost AUC nije bila viša od 0,800 može se zaključiti kako koncentracija C1q ne predstavlja prihvatljivi biomarker za aktivnost SLE i zahvaćenost bubrega.

Sustav komplementa je složena mreža koju čine komponente komplementa te njihovo međudjelovanje kao i interakcija s ciljnim stanicama, receptorima, inhibitorima i autoantitijelima. Na serumsku koncentraciju samih komponenata komplementa utječu akutna stanja, varijacije u broju kopija gena i njihov izražaj te varijabilnost sinteze i katabolizma proteina (Weinstein i sur., 2021.). Uzimajući sve navedeno u obzir, u daljnjim bi istraživanjima paralelno uz markere sustava biljega trebalo uključiti i određivanje drugih laboratorijskih pokazatelja, kako bi se povećala specifičnost i osjetljivost testa.

Na temelju vrijednosti referentnih intervala predloženih od proizvođača te vrijednostima referentnih intervala dobivenim mjerenjem koncentracije komponente komplementa C1q u zdravih ispitanika u ovom istraživanju, bolesni su ispitanici podjeljeni u četiri skupine za svaki pojedini referentni interval (Tablica 13. i Tablica 14.). Unutar dobivenih skupina izračunati su medijani dobivenih koncentracija komponenti komplementa C1q, C3 te C4, postotci bolesnika s koncentracijama komponenti komplementa C3 i C4 ispod donje granice referentnih intervala te postotci bolesnika s aktivnim SLE i bolesnika sa zahvaćenim bubrezima. S obzirom na ranije utvrđenu korelaciju između koncentracija komponente komplementa C1q s komponentama C3 i C4, očekivano je najveći postotak bolesnika s vrijednostima komponenti komplementa C3 i C4 ispod donje granice referentnog intervala u skupinama  $< 15,7$  mg/dL i  $< 20,7$  mg/dL. Od svih skupina najveći postotak bolesnika s aktivnim SLE dobiven je u skupini s koncentracijama 15,7 - 23 mg/dL (64%), pri čemu skupina  $> 33,4$  mg/dL ima 100% ispitanika s aktivnim SLE, iako se u toj skupini nalazi samo 2 bolesnika. Najveći postotak bolesnika sa zahvaćenim bubrezima također je utvrđen u skupini s koncentracijama C1q 15,7 - 23 mg/dL. Usporedbom skupina prema referentnom intervalu proizvođača, zanimljivo je kako se najveći postotak bolesnika s aktivnim SLE i zahvaćenim bubrezima ne nalazi u skupini s najnižom koncentracijom komponente komplementa C1q ( $< 15,7$  mg/dL), već u sljedećoj skupini s vrijednostima koncentracije C1q u rasponu od 15,7 do 23 mg/dL. Ovaj podatak, ipak treba gledati i u kontekstu velike razlike broja ispitanika. S druge strane, u skupini s najnižom koncentracijom komponente komplementa C1q prema našim referentnim intervalima ( $< 20,7$  mg/dL) nalazi se tek nešto više ispitanika s aktivnim SLE i zahvaćenim bubrezima u odnosu na skupinu s nešto višim koncentracijama (20,7 - 27,0 mg/dL), pri čemu su ove skupine objektivnije usporedive s obzirom na broj ispitanika. Zanimljivo je za istaknuti kako su slične granične vrijednosti dobivene kada se ovakav pregled dobivenih rezultata uspoređi s

pridruženim kriterijima krivulja ROC analize s najvećom AUC ( $\leq 23,5$  mg/dL za aktivan SLE i  $\leq 19,9$  mg/dL za zahvaćenost bubrega). Ograničenje ovakvog pristupa pregledu podataka svakako je mali broj ispitanika u pojedinim skupinama, kako u zdravoj skupini potrebnoj za izračun referentnog intervala, tako i u skupinama bolesnih ispitanika s koncentracijama C1q iznad i ispod referentnog intervala. Izračun vlastitog referentnog intervala se unatoč tome pokazao korisnim te opravdava njegov izračun na većem broju zdravih ispitanika.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Određen je referentni interval serumske koncentracije komponente komplementa C1q, u zdravoj odrasloj populaciji koju su činile 33 osobe (14 muškaraca i 19 žena) koji iznosi 20,7 - 33,4 mg/dL.
2. Utvrđena je statistički značajno niža serumska koncentracija komponente komplementa C1q u bolesnih ispitanika u odnosu na zdrave ispitanike ( $P < 0,001$ ).
3. Usporedbom koncentracija komponente komplementa C1q među skupinama bolesnika prema aktivnosti SLE i zahvaćenosti bubrega, uočen je trend nižih koncentracija komponente C1q u bolesnika s aktivnom bolesti te zahvaćenim bubrezima. Izostanak statističke značajnosti, koja je pristuna u dostupnim literaturnim podacima, može se objasniti metodološkim razlikama te razlikama u broju ispitanika.
4. Utvrđene su statistički značajno niže serumske koncentracije komponenata komplementa C3 ( $P=0,002$ ) i C4 ( $P=0,004$ ) u skupini ispitanika s aktivnim SLE u odnosu na ispitanike s neaktivnim SLE.
5. Utvrđene je statistički značajne korelacije između koncentracija C1q i C3 ( $P=<0,001$ ), C1q i C4 ( $P=<0,001$ ) i C3 i C4 ( $P<0,001$ ). Najbolja korelacija dobivena je između C3 i C4, dok je dobra korelacija dobivena C1q i C3, te C1q i C4 s podjednakim vrijednostima korelacijskih koeficijenata.
6. Analizom krivulja operativnih karakteristika (ROC) utvrđeno je kako serumska koncentracija komponente komplementa C1q uz granične vrijednosti komponenata komplementa C3 i C4 nije zadovoljavajuć biomarker za aktivnost SLE i zahvaćenost bubrega. Stoga je potrebno ispitivanje drugih neimunoloških biomarkera kao nadopuna serumskoj koncentraciji komponente C1q.
7. Podjela bolesnih ispitanika u skupine prema vrijednostima referentnih intervala predloženih od proizvođača te vrijednostima referentnih intervala dobivenim mjerenjem koncentracije komponente komplementa C1q u zdravih ispitanika u ovom istraživanju pruža jedinstven uvid u korisnost komponente C1q kao biomarkera te je potrebno ponoviti istraživanje na većem broju ispitanika.

## 7. POPIS KRATICA OZNAKA I SIMBOLA

- ADCC- stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (engl. *antibody dependent cell cytotoxicity*)
- ANOVA- analiza varijance (engl. *analysis of variance*)
- AUC- površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*)
- CLSI- Institut za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical & Laboratory Standards Institute*)
- CR1- receptor komplementa (engl. *complement receptor*)
- CRP- C-reaktivni protein (engl. *C-reactive protein*)
- DAMP- molekularni uzorci povezani s oštećenjem (engl. *damage-associated molecular patterns*)
- DNK- deoksiribonukleinska kiselina
- EBV- Epstein-Barrov virus
- ELISA- enzimski imunosorbent metoda (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- FcγR- receptor Fcγ
- IFN-I - interferon tipa 1
- IgG- imunoglobulin G
- IgM- imunoglobulin M
- IL - interleukin
- LAIR-1- leukocitni receptor nalik imunoglobulinu 1 (engl. *leukocyte-associated Ig-like receptor-1*)
- LDG- granulociti niske gustoće (engl. *low-density granulocytes*)
- LN - lupusni nefritis
- MAC - kompleks koji napada membranu (engl. *membrane attack complex*)
- MASP- serinske proteaze vezane uz MBL (engl. *MBL-associated serine proteases*)
- MBL- lektin koji veže manozu (engl. *mannose-binding lectin*)
- MBSI - sendvič metoda s magnetskim kuglicama (engl. *magnetic bead sandwich immunoassay*)
- miRNK- mikro ribonukleinska kiselina
- NETs- neutrofilne izvanstanične klopke (engl. *neutrophil extracellular traps*)
- NFκB- jezgrin čimbenik kapa B (engl. *nuclear factor κB*)
- PTX3- pentraksin 3 (engl. *pentraxin 3*)
- RIE- raketna elektroforeza (engl. *rocket immune electrophoresis*)
- ROC- operativna karaktersitika (engl. *receiver operating characteristic*)

SLE- sistemski eritemski lupus (engl. *systemic lupus erythematosus*)

TLR- Toll-u sličan receptor (engl. *Toll-like receptor*)

TNF- čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*)

UV- ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*)

## 8. LITERATURA

Accapezzato D, Caccavale R, Paroli MP, Gioia C, Nguyen BL, Spadea L, Paroli M. Advances in the Pathogenesis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Mol Sci*, 2023, 24, 6578.

Alduraibi FK, Tsokos GC. Lupus Nephritis Biomarkers: A Critical Review. *Int J Mol Sci*, 2024, 25, 805.

Alforaih N, Whittall-Garcia L, Touma Z. A Review of Lupus Nephritis. *J Appl Lab Med*, 2022, 7, 1450-1467.

Alghareeb R, Hussain A, Maheshwari MV, Khalid N, Patel PD. Cardiovascular Complications in Systemic Lupus Erythematosus. *Cureus*, 2022, 26671.

Alharbi S. Gastrointestinal Manifestations in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Open Access Rheumatol Res Rev*, 2022, 14, 243-253.

Ameer MA, Chaudhry H, Mushtaq J, Khan OS, Babar M, Hashim T, Zeb S, Tariq MA, Patlolla SR, Ali J, Hashim SN, Hashim S. An Overview of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Pathogenesis, Classification, and Management. *Cureus*, 2022, 30330.

Ayano M, Horiuchi T. Complement as a Biomarker for Systemic Lupus Erythematosus. *Biomolecules*, 2023, 13, 367.

Barber MRW, Falasinnu T, Ramsey-Goldman R, Clarke AE. The global epidemiology of SLE: narrowing the knowledge gaps. *Rheumatology*, 2023, 62, i4-i9.

Barbhaiya M, Costenbader KH. Environmental exposures and the development of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*, 2016, 28, 497-505.



Benoit ME, Clarke EV, Morgado P, Fraser DA, Tenner AJ. Complement Protein C1q Directs Macrophage Polarization and Limits Inflammasome Activity during the Uptake of Apoptotic Cells. *J Immunol*, 2012, 188, 5682-5693.

Biografija Johna R. Hasericka, <https://www.whonamedit.com/doctor.cfm/2168.html>, pristupljeno 10. 4. 2024.

Bolouri N, Akhtari M, Farhadi E, Mansouri R, Faezi ST, Jamshidi A, Mahmoudi M. Role of the innate and adaptive immune responses in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Inflamm Res*, 2022, 71, 537-554.

Ceccarelli F, Govoni M, Piga M, Cassone G, Cantatore FP, Olivieri G, Cauli A, Favalli EG, Atzeni F, Gremese E, Iannone F, Caporali R, Sebastiani M, Ferraccioli GF, Lapadula G, Conti F. Arthritis in Systemic Lupus Erythematosus: From 2022 International GISEA/OEG Symposium. *J Clin Med*, 2022, 11, 6016.

Chi S, Yu Y, Shi J, Zhang Y, Yang J, Yang L, Liu X. Antibodies against C1q Are a Valuable Serological Marker for Identification of Systemic Lupus Erythematosus Patients with Active Lupus Nephritis. *Disease Markers*. 2015, 2015:1-11.

Clarke EV, Weist BM, Walsh CM, Tenner AJ. Complement protein C1q bound to apoptotic cells suppresses human macrophage and dendritic cell-mediated Th17 and Th1 T cell subset proliferation. *J Leukoc Biol*, 2015, 97, 147-160.

Cornet A, Andersen J, Myllys K, Edwards A, Arnaud L. Living with systemic lupus erythematosus in 2020: a European patient survey. *Lupus Sci Med*, 2021, 8, e000469.

Deafen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, Walker A, Mack TM. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1992, 35, 311-318.

Dijkstra DJ, Van De Bovenkamp FS, Abendstein L, Zuijderduijna R, Pool J, Kramer CSM, Slot LM, Drijfhout JW, de Vor L, Gelderman KA, Rooijackers SHM, Zaldumbide A, Vidarsson G, Sharp TH, Parren PWHI, Trouw LA. Human anti-C1q autoantibodies bind specifically to solid-

phase C1q and enhance phagocytosis but not complement activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120, e2310666120.

Dodig S. *Imunokemija*. Zagreb, Medicinska naklada, 2015.

Felten R, Lipsker D, Sibilija J, Chasset F, Arnaud L. The history of lupus throughout the ages. *J Am Acad Dermatol*, 2022, 87, 1361-1369.

Geisbrecht BV, Lambris JD, Gros P. Complement component C3: A structural perspective and potential therapeutic implications. *Semin Immunol*, 2022, 59, 101627.

Ghebrehiwet B, Hosszu KK, Valentino A, Peerschke EIB. The C1q Family of Proteins: Insights into the Emerging Non-Traditional Functions. *Front Immunol*, 2012, 3, 52.

Goilav B, Putterman C. The Role of Anti-DNA Antibodies in the Development of Lupus Nephritis: A Complementary, or Alternative, Viewpoint? *Semin Nephrol*, 2015, 35, 439-443.

Gulati G, Brunner HI. Environmental triggers in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*, 2018, 47, 710-717.

Herrada AA, Escobedo N, Iruretagoyena M, Valenzuela RA, Burgos PI, Cuitio L, Llanos C. Innate Immune Cells' Contribution to Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*, 2019, 10, 772.

Hoover PJ, Costenbader KH. Insights into the epidemiology and management of lupus nephritis from the US rheumatologist's perspective. *Kidney Int*, 2016, 90, 487-492.

Janeway CA, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* 5th edition. New York, Garland Science, 2001.

Kareem S, Jacob A, Mathew J, Quigg RJ, Alexander JJ. Complement: Functions, location and implications. *Immunology*, 2023, 170, 180-192.

Li X, Ptacek TS, Brown EE, Edberg JC. Fcγ receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun*, 2009, 10, 380-389.

Lupusni nefritis, 2023., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499817/>, pristupljeno 15. 4. 2024.

Ma WT, Gao F, Gu K, Chen DK. The Role of Monocytes and Macrophages in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review. *Front Immunol*, 2019, 10, 1140.

Macedo ACL, Isaac L. Systemic Lupus Erythematosus and Deficiencies of Early Components of the Complement Classical Pathway. *Front Immunol*, 2016, 7, 55.

Morales E, Galindo M, Trujillo H, Praga M. Update on Lupus Nephritis: Looking for a New Vision. *Nephron*, 2021, 145(1):1-13

Nahm FS. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. *Korean J Anesthesiol*. 2022, 75(1):25-36.

Noris M, Remuzzi G. Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin Nephrol*, 2013, 33, 479-492.

Perricone C, Versini M, Ben-Ami D, Gertel S, Abdulla W, Segel MJ, Ceccarelli F, Conti F, Cantarini L, Bogdanos DP, Antonelli A, Amital H, Valesini G, Shoenfeld Y. Smoke and autoimmunity: The fire behind the disease. *Autoimmun Rev*, 2016, 15, 354-374.

Reid KBM. Complement Component C1q: Historical Perspective of a Functionally Versatile, and Structurally Unusual, Serum Protein. *Front Immunol*, 2018, 9, 764.

Ricklin D, Reis ES, Mastellos DC, Gros P, Lambris JD. Complement component C3 – The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense. *Immunol Rev*, 2016, 274, 33-58.

Sandholm K, Persson B, Skattum L, Eggersten G, Nyman D, Gunnarsson I, Svenungson E, Nilsson B, Ekdahl KN. Evaluation of a Novel Immunoassay for Quantification of C1q for Clinical Diagnostic Use. *Front Immunol*, 2019, 10:7.

Santacruz JC, Mantilla MJ, Rueda I, Pulido S, Rodriguez-Salas G, Londono J. A Practical Perspective of the Hematologic Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Cureus*, 2022, 22938.

Sarwar S, Mohamed AS, Rogers S, Sarmast ST, Kataria S, Mohamed KH, Khalid MZ, Saeeduddin MO, Shiza ST, Ahmad S, Awais A, Singh R. Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus: A 2021 Update on Diagnosis, Management, and Current Challenges. *Cureus*, 2021, 17969.

Satyam A, Hisada R, Bhargava R, Tsokos MG, Tsokos GC. Intertwined pathways of complement activation command the pathogenesis of lupus nephritis. *Transl Res*, 2022, 245, 18-29.

Scott D, Botto M. The paradoxical roles of C1q and C3 in autoimmunity. *Immunobiology*, 2016, 221, 719-725.

Shin JI, Lee KH, Park S, Yang JW, Kim HJ, Song K, Lee S, Na H, Jang YJ, Nam JY, Kim S, Lee C, Hong C, Kim C, Kim M, Choi U, Seo J, Jin H, Yi BM, Jeong SJ, Kim YJH, Kronbichler A. Systemic Lupus Erythematosus and Lung Involvement: A Comprehensive Review. *J Clin Med*, 2022, 11, 6714.

Sistemiški eritemski lupus, 2023., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535405/>, pristupljeno 19. 3. 2024.

Son M, Diamond B. C1q-Mediated Repression of Human Monocytes Is Regulated by Leukocyte-Associated Ig-Like Receptor 1 (LAIR-1). *Mol Med*, 2014, 20, 559-568.

Sterner RM, Hartono SP, Grande JP. The Pathogenesis of Lupus Nephritis. *J Clin Cell Immunol*, 2014, 5, 1000205.

Stojan G, Petri M. Anti-C1q in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2016, 25(8):873-877.

Svjetski dan borbe protiv lupusa, 2018., <https://www.hzjz.hr/sluzba-javno-zdravstvo/svjetski-dan-borbe-protiv-lupusa/>, pristupljeno 22. 3. 2024.

Šestan M, Kifer N, Arsov T, Cook M, Ellyard J, Vinuesa CG, Jelusić M. The Role of Genetic Risk Factors in Pathogenesis of Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 45, 5981-6002.

Tan Y, Song D, Wu L, Yu F, Zhao M. Serum levels and renal deposition of C1q complement component and its antibodies reflect disease activity of lupus nephritis. *BMC Nephrol*, 2013,14(1):63.

Wang H, Liu M. Complement C4, Infections, and Autoimmune Diseases. *Front Immunol*, 2021, 12, 694928.

Weinstein A, Alexander RV, Zack DJ. A Review of Complement Activation in SLE. *Curr Rheumatol Rep*. 2021, 23(3):16.

Xu B, Zhang Y, Yang Y, Liu Y, Feng J. Diagnostic performance of serum cystatin C and complement component 1q in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1):267.

## 9. SAŽETAK/SUMMARY

### SAŽETAK

Sustav komplementa čini više od 30 proteina prisutnih u plazmi i na staničnim membranama, čije funkcije uključuju moduliranje imunskog odgovora, liziranje stanica patogena te uklanjanje staničnog otpada i imunokompleksa. Komponenta komplementa C1q prepoznaje imunokomplekse nastale kao dio imunskog odgovora te započinje klasičan put aktivacije sustava komplementa. Sistemski eritemski lupus (SLE) je multisistemska autoimuna bolest koju karakterizira nastanak te odlaganje imunokompleksa u različitim organima. Najteža komplikacija SLE koja nastaje nakupljanjem imunokompleksa u bubrezima naziva se lupusni nefritis. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi važnost određivanja koncentracije komponente komplementa C1q kao potencijalnog biomarkera u serumu pacijenata sa SLE te povezanost s komponentama komplementa C3 i C4 koje su dio redovne obrade i praćenja bolesnika.

Istraživanje je provedeno u 101 ispitaniku, od kojih 33 zdravih i 68 oboljelih od SLE. Na temelju izmjerenih koncentracija komponente komplementa C1q u serumu zdravih ispitanika, izračunat je referentni interval koji iznosi 20,7 - 33,4 mg/dL, te se razlikovao od referentnog intervala predloženim od proizvođača (15,7 - 30,6 mg/dL). Usporedbom vrijednosti koncentracija C1q dobivenih u uzorcima zdravih i bolesnik ispitanika, utvrđena je statistički značajno niža vrijednost koncentracije C1q u serumu bolesnih ispitanika ( $P < 0,001$ ). U skupini bolesnih ispitanika utvrđena je statistički značajna korelacija između koncentracije komponente komplementa C1q i koncentracije komponenta komplementa C3 ( $r=0,450$ ;  $P < 0,001$ ) i C4 ( $r=0,460$ ;  $P < 0,001$ ). Dobiveni rezultati podudarni su s dosadašnjim spoznajama o SLE i literaturnim navodima. Utvrđene značajne razlike i trendovi pokazuju kako se komponenta komplementa C1q može smatrati potencijalnim biomarkerom, ali je istraživanje potrebno nadopuniti upotrebom različitih analitičkih sustava te većim brojem ispitanika.

## SUMMARY

The complement system consists of more than 30 proteins present in plasma and on cell membranes, whose functions include modulation of the immune response, lysis of pathogen cells, and removal of cellular debris and immune complexes. The complement component C1q recognizes immune complexes formed as part of the immune response and initiates the classical pathway of complement activation. Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multisystem autoimmune disease characterized by the formation and deposition of immune complexes in various organs. The most severe complication of SLE resulting from the accumulation of immune complexes in the kidneys is termed lupus nephritis. The aim of this study was to determine the significance of measuring the concentration of complement component C1q as a potential biomarker in the serum of patients with SLE, as well as its correlation with complement components C3 and C4, which are part of routine patient evaluation and monitoring.

The study was conducted on 101 participants, including 33 healthy individuals and 68 patients with SLE. Based on the measured concentrations of complement component C1q in the serum of healthy subjects, a calculated reference interval was 20.7 - 33.4 mg/dL, which differed from the reference interval proposed by the manufacturer (15.7 - 30.6 mg/dL). The comparison of C1q concentrations obtained in healthy and patient samples revealed a statistically significant lower concentration of C1q in the serum of patients ( $P < 0.001$ ). In the patient group, a statistically significant correlation was found between the concentration of complement component C1q and the concentrations of complement components C3 ( $r = 0.450$ ;  $P < 0.001$ ) and C4 ( $\rho = 0.460$ ;  $P < 0.001$ ). The obtained results are consistent with existing knowledge regarding SLE and literature references. The identified significant differences and trends suggest that complement component C1q may be considered a potential biomarker; however, further research is necessary, incorporating various analytical systems and a larger number of participants.

**10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION  
CARD**



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb  
Kišpatićeva ulica 12, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Značaj određivanja koncentracije komponente komplementa C1q u pacijenata sa sistemskim eritemskim lupusom

Lovro Ljubić

#### SAŽETAK

Sustav komplementa čini više od 30 proteina prisutnih u plazmi i na staničnim membranama, čije funkcije uključuju moduliranje imunskog odgovora, liziranje stanica patogena te uklanjanje staničnog otpada i imunokompleksa. Komponenta komplementa C1q prepoznaje imunokomplekse nastale kao dio imunskog odgovora te započinje klasičan put aktivacije sustava komplementa. Sistemski eritemski lupus (SLE) je multisistemska autoimuna bolest koju karakterizira nastanak te odlaganje imunokompleksa u različitim organima. Najteža komplikacija SLE koja nastaje nakupljanjem imunokompleksa u bubrezima naziva se lupusni nefritis. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi važnost određivanja koncentracije komponente komplementa C1q kao potencijalnog biomarkera u serumu pacijenata sa SLE te povezanost s komponentama komplementa C3 i C4 koje su dio redovne obrade i praćenja bolesnika. Istraživanje je provedeno u 101 ispitaniku, od kojih 33 zdravih i 68 oboljelih od SLE. Na temelju izmjerenih koncentracija komponente komplementa C1q u serumu zdravih ispitanika, izračunat je referentni interval koji iznosi 20,7 - 33,4 mg/dL, te se razlikovao od referentnog intervala predloženim od proizvođača (15,7 - 30,6 mg/dL). Usporedbom vrijednosti koncentracija C1q dobivenih u uzorcima zdravih i bolesnik ispitanika, utvrđena je statistički značajno niža vrijednost koncentracije C1q u serumu bolesnih ispitanika ( $P < 0,001$ ). U skupini bolesnih ispitanika utvrđena je statistički značajna korelacija između koncentracije komponente komplementa C1q i koncentracije komponenta komplementa C3 ( $r = 0,450$ ;  $P = < 0,001$ ) i C4 ( $\rho = 0,460$ ;  $P = < 0,001$ ). Dobiveni rezultati podudarni su s dosadašnjim spoznajama o SLE i literaturnim navodima. Utvrđene značajne razlike i trendovi pokazuju kako se komponenta komplementa C1q može smatrati potencijalnim biomarkerom, ali je istraživanje potrebno nadopuniti upotrebom različitih analitičkih sustava te većim brojem ispitanika.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 58 stranica, 13 grafičkih prikaza, 15 tablica i 54 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Komponenta komplementa C1q, sistemski eritemski lupus, lupusni nefritis, nefelometrija

Mentor: **Dr. sc. Désirée Coen Herak**, naslovni docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Désirée Coen Herak**, naslovni docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Željka Vogrinc**, naslovni docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ana Kozmar**, naslovni docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: listopad 2024.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Centre Zagreb  
Kišpatićeva ulica 12, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### The significance of determining complement component C1q concentration in patients with systemic lupus erythematosus

Lovro Ljubić

#### SUMMARY

The complement system consists of more than 30 proteins present in plasma and on cell membranes, whose functions include modulation of the immune response, lysis of pathogen cells, and removal of cellular debris and immune complexes. The complement component C1q recognizes immune complexes formed as part of the immune response and initiates the classical pathway of complement activation. Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multisystem autoimmune disease characterized by the formation and deposition of immune complexes in various organs. The most severe complication of SLE resulting from the accumulation of immune complexes in the kidneys is termed lupus nephritis. The aim of this study was to determine the significance of measuring the concentration of complement component C1q as a potential biomarker in the serum of patients with SLE, as well as its correlation with complement components C3 and C4, which are part of routine patient evaluation and monitoring. The study was conducted on 101 participants, including 33 healthy individuals and 68 patients with SLE. Based on the measured concentrations of complement component C1q in the serum of healthy subjects, a reference interval was calculated to be 20.7 - 33.4 mg/dL, which differed from the reference interval proposed by the manufacturer (15.7 - 30.6 mg/dL). Comparison of C1q concentrations obtained from healthy and patient samples revealed a statistically significant lower concentration of C1q in the serum of patients ( $P < 0.001$ ). In the patient group, a statistically significant correlation was found between the concentration of complement component C1q and the concentrations of complement components C3 ( $r = 0.450$ ;  $P < 0.001$ ) and C4 ( $\rho = 0.460$ ;  $P < 0.001$ ). The obtained results are consistent with existing knowledge regarding SLE and literature references. The identified significant differences and trends suggest that complement component C1q may be considered a potential biomarker; however, further research is necessary, incorporating various analytical systems and a larger number of participants.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 58 pages, 13 figures, 15 tables and 54 references. Original is in Croatian language.

Keywords: C1q complement component, systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, nephelometry

Mentor: **Désirée Coen Herak, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Désirée Coen Herak, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Željka Vogrinc, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Kozmar, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: October 2024.