

Sposób analizy białek w moczu

5 **Przedmiot wynalazku**

Wynalazek dotyczy sposobu analizy białek w moczu, obejmującego przygotowanie próbki moczu oraz detekcję białek, który to sposób może mieć zastosowanie w celu oceny stanu zdrowia pacjenta oraz na przykład w transplantologii. Wynalazek znajduje zastosowanie szczególnie w ocenie ryzyka odrzucenia przeszczepu nerki.

10 **Stan techniki**

Mocz jako materiał do badań diagnostycznych

Mocz jest niemal idealnym źródłem do wykrywania biomarkerów wielu chorób, w tym nowotworowych. Jest on łatwo dostępny od niemal wszystkich pacjentów, jego pozyskiwanie jest relatywnie proste i nie wymaga inwazyjnych procedur (odnośnik literaturowy nr (1)). Dlatego też badanie składu moczu (proteomu, metabolomu, a nawet obecności określonych komórek) stanowi przedmiot intensywnych badań laboratoriów na całym świecie. Pomimo tych zalet istnieją również problemy związane z analizą moczu. Zaliczyć do nich można między innymi dużą ilość soli oraz innych związków, które mogą zaburzać właściwy sygnał, niskie stężenie białek (w przypadku badania proteomu), ogólną zmienność składu moczu wynikającą z różnic stylu życia i odżywiania pomiędzy poszczególnymi osobami.

Mocz jako materiał do badań jest powszechnie wykorzystywany w diagnostyce klinicznej do oceny ogólnego stanu zdrowia pacjenta czy w badaniach przesiewowych. Zgodnie ze standardami postępowania z próbką moczu Europejskiej Konfederacji Medycyny Laboratoryjnej (ECLM) mocz jest wirowany w wirówce z chłodzeniem (4°C) przez 5 minut w 400xg (2). Uzyskiwany osad jest oceniany za pomocą mikroskopu, a supernatant poddawany dalszym analizom chemicznym i biochemicznym, co jest wykorzystywane m.in. do:

- Diagnostyki chorób układu moczowego oraz nerek;
- Diagnostyki chorób metabolicznych np. różnego typu porfirii;
- Diagnostyki szpiczaka mnogiego - białko Bence-Jonesa.

30 W przypadku analizy proteomu problemem staje się losowa agregacja i degradacja białek, przez co nawet pojedyncze białko może występować w moczu w wielu formach o różnej rozpuszczalności. Dlatego też, dla rzetelnej analizy proteomicznej konieczna jest kompletna

próbka moczu, gdzie badaniu poddawana jest zarówno frakcja rozpuszczalna, standardowo badana dotychczas, jak i frakcja nierozpuszczalna, w której skład wchodzi komórki pacjenta, bakterie oraz wielkocząsteczkowe agregaty, do tej pory rutynowo usuwana z analiz poprzez zastosowanie procedury wirowania (odnośnik literaturowy (3) (4) (5) (6)).

5 **Badanie odrzucenia przeszczepu**

Wystąpienie epizodu ostrego odrzucania przeszczepionego organu w ciągu pierwszego półrocza po przeszczepie zwiększa ryzyko utraty narządu do 50%. Ostre odrzucanie przeszczepu nerki koreluje z powstawaniem włóknienia śródmiąższowego i zaniku cewek, czyli sprzyja powstaniu przewlekłej nefropatii przeszczepu, która jest główną przyczyną utraty narządu w ciągu pierwszego roku od transplantacji.

Ostre odrzucenie przeszczepionej nerki jest zdefiniowane jako nagłe pogorszenie funkcji narządu związane z określonymi zmianami patologicznymi w przeszczepie. Wyróżnia się dwie główne postaci histologiczne ostrego odrzucania:

1. Ostre odrzucenie komórkowe - charakteryzujące się infiltracją narządu przez limfocyty T i inne komórki zapalne.

2. Ostre odrzucenia humoralne – charakteryzujące się uszkodzeniem tkanki, spowodowane aktywnością krążących we krwi przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom dawcy narządu i obecnością immunologicznych dowodów tego procesu (np. depozytów C4d w narządzie).

Wczesne odrzucenie typu humoralnego występuje z reguły w pierwszych kilku miesiącach po przeszczepieniu, szczególnie u pacjentów wysoko immunizowanych. Najczęstszą nieprawidłowością jest wzrost poziomu kreatyniny. Ostateczne rozpoznanie dokonywane jest na podstawie biopsji nerki, a markerem uszkodzenia humoralnego jest rozlane gromadzenie się znacznika przeciwciał anty-C4d w badaniu immunofluorescencyjnym. Na podstawie obrazu klinicznego i metod obrazowych odrzucenie tego typu jest łatwe do przeoczenia i trudne do odróżnienia od martwicy cewek nerkowych (ATN). Dodatkowo odrzucenie typu humoralnego może być powikłane z odrzuceniem komórkowym, co jeszcze bardziej utrudnia rozpoznanie i skuteczne leczenie.

Chociaż proces ostrego odrzucania występuje głównie we wczesnym okresie pooperacyjnym, to jednak w niektórych przypadkach dochodzi do procesu ostrego odrzucania w kilka miesięcy lub nawet lat po przeszczepieniu narządu. Nie ma jednoznacznej granicy dzielącej epizody ostrego odrzucenia na wczesne i późne. Obecnie większość ośrodków transplantacyjnych przyjmuje granicę pomiędzy wczesnym a późnym odrzucaniem po trzecim miesiącu od przeszczepienia narządu. Przewlekłe odrzucanie jest częścią ogólnego procesu, zwanego przewlekłym uszkodzeniem przeszczepu CAI (ang. Chronic Allograft Injury) i jest, następną po zgonie pacjenta z przyczyn naczyniowo-sercowych, główną przyczyną utraty przeszczepu. Od

początku lat 70-tych biopsja przeszczepionej nerki pozostaje złotym standardem diagnostyki zaburzeń czynności narządu, a także oceny adekwatności immunosupresji. Materiał do badania histopatologicznego pobiera się najczęściej metodą biopsji gruboigłowej.

5 Biopsje „ze wskazań” wykonywane są w przypadku zaistnienia niedającej się wyjaśnić metodami nieinwazyjnymi niesatysfakcjonującej czynności przeszczepu i w przypadku wystąpienia odchyłań w badaniu ogólnym moczu, przede wszystkim białkomoczu.

Około 1/3 potwierdzonych histologicznie epizodów ostrego odrzucania przebiega subklinicznie, to znaczy przy prawidłowych wartościach kreatyniny i braku innych objawów klinicznych.

10 Przeszczepienie nerki u biorcy wysoko zimmunizowanego jest obarczone wysokim ryzykiem odrzucania zależnego od przeciwciał AMR (ang. Antibody-Mediated Rejection), a nawet przy braku AMR przeżycie przeszczepu w tej grupie jest znacząco gorsze, co może się wiązać z procesem przewlekłego odrzucania narządu zależnego od przeciwciał. Dlatego ciągle istnieje zapotrzebowanie na coraz czulsze metody umożliwiające precyzyjny dobór narządu do przeszczepu w oparciu o identyfikację szkodliwych przeciwciał.

15 Monitorowanie obecności przeciwciał po przeszczepieniu nadal nie jest rutynowym działaniem, ale obszarem poddawanych intensywnym badaniom. Szczególnie istotna jest produkcja *de novo* przeciwciał anty-HLA, a nie tylko DSA-specyficznych. (ang. Donor-Specific Antibodies)

20 Identyfikacja przeciwciał odbywa się metodą fluorymetryczną. Polistyrenowe mikrokulki opłaszczane są antygenami HLA, do których łączą się przeciwciała pochodzące z surowicy. Dalej do układu dodaje się znakowane fluorescencyjnie immunoglobuliny IgG, które łączą się z przeciwciałami z surowicy. Następnie sygnał fluorescencyjny jest analizowany przez program komputerowy dając informację o zawartości przeciwciał anty-HLA w danej surowicy. W zależności od rodzaju testu mikrokulki są pokryte jednym antygenem (testy typu single antigen) lub sześcioma antygenami (testy typu screening i PRA (ang. Panel Reactive Antibody)), co
25 przekłada się na rozdzielczość testu.

Przeciwciała anty-HLA występują *de novo* u 25,7% biorców, przy czym w zależności od metody (ELISA, cytometria, Luminex) ich wykrywalność waha się od 15,9% (ELISA) do 25,7% (Luminex). Najwydatniej na przeżycie przeszczepu wpływają przeciwciała anty-HLA o swoistości DSA obecne wśród innych swoistych cząsteczek wytworzonych *de novo*. Jednak
30 przeciwciała DSA wykrywa się tylko u 16% biorców anty-HLA(+). Na niską wykrywalność przeciwciał DSA-specyficznych może mieć wpływ ich adsorpcja w tkance przeszczepu.

Niestety biopsja jest zabiegiem inwazyjnym dla pacjenta. W celu pobrania próbki konieczny jest wykwalifikowany personel medyczny, odpowiednia aparatura, sprzęt oraz pomieszczenia niezbędne do przeprowadzenia zabiegu. Z tego powodu nie jest możliwe monitorowanie stanu

pacjenta na bieżąco, co często skutkuje wykryciem odrzutu przeszczepu dopiero w momencie, gdy zmiany są już nieodwracalne.

Do diagnostyki odrzutu przeszczepu można wykorzystać fakt, że występują różnice w rozpuszczalności oraz ilości przeciwciała IgG w moczu u osób zdrowych i pacjentów po przeszczepie nerki. U osób zdrowych elementy IgG są rozpuszczone w moczu i nie wykazują tendencji do agregacji i precypitacji. W przypadku pacjentów po przeszczepie nerki, po operacji następuje wzrost stężenia przeciwciał, a także ich spontaniczne wytrącanie się z roztworu. Ten proces wytrącania jest jednak zjawiskiem losowym, dlatego wykorzystywanie do badań jedynie osadu lub supernatantu może dawać błędne wyniki.

- 5
- 10 Twórcy niniejszego wynalazku, nieoczekiwanie stwierdzili, że możliwe jest wykorzystanie do analizy białek (w szczególności przeciwciał lub komponentów dopełniacza) moczu pełnego (niewirowanego). Rutynowy i uznany jako konieczny standard etap wirowania zastąpiono mieszaniem próbek w celu stworzenia jednorodnej zawiesiny będącej przedmiotem analiz proteomicznych. Twórcy opracowali sposób analizy próbek według wynalazku, dzięki któremu
- 15 można monitorować zmiany poziomu białek w moczu pacjentów, a w korzystnym przykładzie wykonania wynalazku, monitorować zmiany stężenia przeciwciał IgG w moczu u pacjentów po przeszczepie, dla określenia jego stanu.

Istota wynalazku

- 20 Wynalazek dotyczy wykorzystania w celach diagnostycznej analizy białek, w szczególności przeciwciał, korzystnie przeciwciał IgG lub komponentów dopełniacza, moczu pełnego - niewirowanego, zawierającego większą liczbę specyficznych białek, w porównaniu do analizowanego rutynowo - wirowanego.

W przypadku analizy białek problemem jest tendencja białek do losowej agregacji i degradacji, przez co nawet pojedyncze białko może występować w moczu w wielu formach o różnej rozpuszczalności. Jak stwierdzili twórcy niniejszego wynalazku, u różnych pacjentów, w różnych dniach obserwować można różne zachowania białek w wirowanej próbce moczu (Fig. 1): przechodzenia w fazę nierozpuszczalnych agregatów (większa ilość białek po wirowaniu znajduje się w pelecie- „↓”), bądź pozostawania w fazie rozpuszczonej (większa ilość białek po wirowaniu znajduje się w supernatancie- „↑”) po wirowaniu, co przedstawiono na przykładzie trzech białek- HSA (Human Serum Albumin, odnośnik literaturowy nr (7)), C3 (komponent dopełniacza 3, odnośnik literaturowy nr (8)), IgG (Immunoglobulina G, odnośnik literaturowy nr (9)). Jak wynika z danych przedstawionych na Fig. 1, agregacja i wytrącanie się z roztworu jest w przypadku białek w moczu zjawiskiem częstym i różnym dla każdego białka. HSA zwykle pozostaje w formie rozpuszczalnej, dlatego stanowi marker białkomoczu, rutynowo badany w

35 diagnostyce klinicznej.

Z przedstawionych powyżej powodów, dla rzetelnej analizy białek konieczna jest pełna próbka moczu, gdzie badaniu poddawana jest zarówno frakcja rozpuszczalna, standardowo badana dotychczas, jak i frakcja nierozpuszczalna, w której skład wchodzi komórki pacjenta, bakterie oraz wielkocząsteczkowe agregaty, do tej pory rutynowo usuwana z analiz poprzez zastosowanie procedury wirowania.

Przedmiotem wynalazku jest więc sposób analizy białek w próbce moczu, obejmujący przygotowanie próbki moczu oraz detekcję białek, w którym etap przygotowania próbki moczu do analizy obejmuje mieszanie próbki bez jej wirowania, a detekcja białek wykonywana jest dla moczu pełnego.

Sposób według wynalazku obejmuje więc przygotowanie próbki moczu do analizy, w tym mieszanie i zawieszanie próbki, ale bez etapu wirowania oraz następującą detekcję analizowanych białek.

W sposobie według wynalazku można stosować różne, znane w dziedzinie, sposoby detekcji analizowanych białek. Korzystne jest wykorzystywanie metody detekcji, której specyficzność jest na tyle duża, iż dodatkowe źródło interferencji jakim są elementy z komórek, nie stanowi problemu. Taką metodą jest metoda Western Blot.

Korzystnie, sposób według wynalazku ma zastosowanie w analizie przeciwciał, korzystniej przeciwciał IgG.

W innym korzystnym przykładzie wykonania wynalazku, białkami są komponenty dopełniacza, w szczególności C3.

Stosowany tu termin „mocz pełny” oznacza mocz zawierający w sobie wszystkie elementy znajdujące się w pęcherzu moczowym, wśród których znajdują się również nierozpuszczalne agregaty białkowe, oraz komórki nabłonka i bakteryjne dostające się do moczu w trakcie wydalania.

W przykładzie wykonania, sposób według wynalazku ma zastosowanie do diagnostyki *ex vivo* ryzyka immunologicznego odrzucenia przeszczepu nerki, który obejmuje monitorowanie ogólnego poziomu przeciwciał IgG i/lub komponentów C3 w próbkach moczu pełnego, bez etapu wirowania przed przystąpieniem do detekcji białek.

Dodatkowo, twórcy wykazali, że pomiar dokonywany sposobem według wynalazku jest stabilny niezależnie od sposobu przechowywania próbki, co daje pewność, iż zmiana poziomu przeciwciał w przypadku próbek od pacjentów jest wywołana reakcją immunologiczną organizmu, a nie artefaktem preparatyki.

Twórcy wynalazku, nieoczekiwanie stwierdzili, że analiza próbki moczu sposobem według wynalazku pozwala na szybką i wiarygodną analizę poziomu przeciwciał w moczu, w

szczegółności w celu wczesnego wykrywania potencjalnego odrzutu przeszczepu nerki. Jak wspomniano wyżej, u pacjentów z ryzykiem odrzutu rośnie poziom przeciwciał IgG w moczu, natomiast precypitacja tychże przeciwciał może następować losowo, stąd wirowanie próbki i badanie osadu może dawać błędne wyniki. Niedogodność tę niweluje sposób według wynalazku.

Ponadto, twórcy nieoczekiwanie stwierdzili, że występuje również korelacja między zmianami poziomu przeciwciał IgG oraz komponentów C3 w kolejnych dniach po zabiegu przeszczepienia nerki, co sugeruje, że IgG i C3 tworzą kompleks (Przykład 4).

W korzystnym przykładzie wykonania sposobu według wynalazku, analiza obejmuje więc monitorowanie zmian poziomu przeciwciał IgG i/lub komponentów dopełniacza, w szczególności C3, w moczu pełnym pobranym od pacjenta po zabiegu przeszczepienia nerki, przy czym wzrost poziomu przeciwciał IgG i/lub komponentów dopełniacza, w szczególności C3 w czasie wskazuje na ryzyko odrzucenia przeszczepu, a spadek poziomu przeciwciał IgG i/lub komponentów dopełniacza, w szczególności C3 w czasie wskazuje na prawdopodobne przyjęcie się przeszczepu. Sposób analizy białek w próbce moczu według wynalazku umożliwia uzyskanie wyniku już w ciągu kilku godzin.

Sposób według powyższego przykładu wykonania wynalazku ma wiele zalet w stosunku do sposobów analizy ryzyka odrzucenia przeszczepu ze stanu techniki.

- Metoda jest nieinwazyjna dla pacjentów;
- Umożliwia pobieranie próbek od pacjenta nawet kilka razy dziennie w celu monitorowania stanu przeszczepu;
- Jest relatywnie szybka, gdyż wynik analizy uzyskuje się po kilku godzinach;
- W porównaniu do wcześniejszych metod jest specyficzna w stosunku do immunologicznego odrzutu przeszczepu.

Dodatkowo, twórcy wykazali, że pomiar dokonywany sposobem analizy białek w próbce moczu według wynalazku jest stabilny niezależnie od sposobu przechowywania próbki, co daje pewność, iż zmiana poziomu białek, nie jest artefaktem preparatyki, np. zmiana poziomu IgG w przypadku próbek od pacjentów jest wywołana reakcją immunologiczną organizmu.

Sposób analizy białek w próbce moczu według wynalazku korzystnie obejmuje następujące etapy:

- a. zawieszanie próbki moczu;
- b. dodanie do próbki moczu buforu obciążającego, ułatwiającego nakładanie próbek białkowych na żel;

- c. rozbitcie agregatów białkowych przez, na przykład, zagotowanie próbki moczu lub trawienie enzymatyczne;
- d. nałożenie próbki na żel poliakrylamidowy i elektroforezę SDS-PAGE;
- e. usunięcie ze studzienek nadmiaru soli;
- 5 f. detekcję białek.

Specjalista w dziedzinie z łatwością dobierze odpowiedni bufor obciążający do etapu b). Przykładem korzystnego buforu obciążającego jest bufor Laemmli'ego o składzie: 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -merkaptotanol, 0,002% błękit bromofenolu, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8.

Korzystnie, próbka moczu po pobraniu przechowywana jest w pojemniku szklanym.

- 10 Korzystnie, do próbki moczu przed analizą dodawany jest SDS do stężenia około 1% v/v

Próbka moczu po pobraniu, a przed analizą korzystnie jest zamrażana, na przykład w -20°C , jeśli musi być przechowywana dłużej niż przez około 16 godzin. Przed analizą próbka korzystnie rozmrażana jest w temperaturze pokojowej ($\sim 23^{\circ}\text{C}$).

- 15 Etap a) może być przeprowadzany, na przykład, przez intensywne pipetowanie lub z wykorzystaniem Vortexu.

Etap c) korzystnie wykonywany jest w temperaturze 95°C przez 2 minuty.

Etap d) korzystnie wykonywany jest w 4-15% gradientowym żelu poliakrylamidowym. Elektroforeza korzystnie przebiega w buforze 1x Tris-glicyna przez około 30 min przy natężeniu około 40 mA/żel.

- 20 Etap f) korzystnie wykonywany jest z pomocą techniki Western blot. Można jednak wykorzystywać dowolną inną znaną w dziedzinie odpowiednią technikę detekcji białek jak na przykład spektrometria mas.

Krótki opis figur

- 25 **Fig. 1** przedstawia porównanie zachowania białek w moczu, przechodzenia w fazę nierozpuszczalnych agregatów (większa ilość białek po wirowaniu znajduje się w pelecie- „↓”), bądź pozostawania w fazie rozpuszczonej (większa ilość białek po wirowaniu znajduje się w supernatancie- „↑”) po wirowaniu, na przykładzie trzech białek- HSA, C3, IgG.

- 30 **Fig. 2** przedstawia wyniki analizy próbek moczu metodą Western blot po inkubacji w różnych warunkach. A: 1- ION60/D, 2- ION60/G, 3- ION37/D, 4- ION37/G, 5- ION37/D, 6- ION37/G, 7- ION23/ZM, 8- ION23/ZM, 9- ION23/D, 10- ION23/G, 11- ION23/D, 12- ION23/G, 13- ION23/ZM, 14- M, 15- ION4/ZM; B: 1- M, 2- NI, 3- M, 4- NI, 5- TCA/ZAW, 6- TCA/ZAW, 7- W30/SUP, 8- W30/SUP, 9- W30/ZAW, 10- W30/ZAW, 11- ION-20/ZW, 12- ION4/G, 13- ION4/ZM, 14- ION4/G, 15- ION4/ZM. D – próbka pobierana z dolnej części pojemnika z moczem; G – próbka

pobierana z górnej części pojemnika z moczem; ION-20 – inkubacja próbki przez noc w -20 °C; ION4 – inkubacja próbki przez noc w 4 °C; ION23 – inkubacja próbki przez noc w temperaturze pokojowej; ION37 – inkubacja próbki przez noc w 37 °C; ION60 – inkubacja próbki przez noc w 60 °C; M – marker ciężaru cząsteczkowego „PageRuler™ Unstained Protein Ladder” (firmy ThermoFisher Scientific); ZM – próbka pobrana ze środkowej części pojemnika z moczem po uprzednim mieszaniu przy pomocy Vortexu lub przez pipetowanie; NI – próbka przygotowana bez wstępnej inkubacji; SUP – supernatant po wirowaniu; TCA – strącanie białek za pomocą procedury z wykorzystaniem kwasu trójchlorooctowego; W30 - wirowanie próbki przez 10 min 30 000 g w 4 °C; ZAW – zawieszanie fazy stałej w 160 µl buforu Leamliego.

10 **Fig. 3** przedstawia zmiany poziomu przeciwciał IgG w moczu pacjentów po przeszczepie nerki, na podstawie analizy ilości ciężkiego łańcucha IgG metodą Western blot. A: Zawartość poszczególnych studzienek: 2: M; 3-8: Pacjent A 1, 2, 3, 6, 8, 9 dzień po operacji; 9-15: Pacjent B 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11 dzień po operacji; B: Zawartość poszczególnych studzienek: 3: M; 4-9: Pacjent C 2, 3, 4, 6, 9, 11 dzień po operacji; 10-15: Pacjent D 1, 2, 3, 4, 7, 8 dzień po operacji;
15 C: Zawartość poszczególnych studzienek: 1: M; 3-8: Pacjent E 1, 2, 3, 4, 7, 11 dzień po operacji; 9-15: Pacjent F 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11 dzień po operacji.

Fig. 4 przedstawia zmiany poziomu komponentu C3 w moczu pacjentów po przeszczepie nerki, na podstawie analizy ilości jego dwóch form w próbce (75 kDa i 120 kDa) metodą Western blot. A: Zawartość poszczególnych studzienek: 2: M; 3-8: Pacjent A 1, 2, 3, 6, 8, 9 dzień po operacji;
20 9-15: Pacjent B 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11 dzień po operacji; B: Zawartość poszczególnych studzienek: 3: M; 4-9: Pacjent C 2, 3, 4, 6, 9, 11 dzień po operacji; 10-15: Pacjent D 1, 2, 3, 4, 7, 8 dzień po operacji; C: Zawartość poszczególnych studzienek: 1: M; 3-8: Pacjent E 1, 2, 3, 4, 7, 11 dzień po operacji; 9-15: Pacjent F 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11 dzień po operacji;

Fig. 5 przedstawia obraz frakcji po chromatografii FPLC na kolumnie typu Size Exclusion. 25 Próbkę były analizowane za pomocą metody Western Blot, pod kątem występowania różnych rozpuszczalnych form, w moczu, przeciwciała IgG (bloty C i D) oraz komponentu C3 (bloty A i B). Zawartość poszczególnych studzienek: A,C: 1: M; 2: Próbkę supernatantu moczu pacjenta F (dzień drugi po operacji) nakładana na kolumnę; 3-14: Frakcje 1-12 z kolumny; 15: Próbkę supernatantu moczu pacjenta F (dzień drugi po operacji) nakładana na kolumnę. B,D: 1: Próbkę supernatantu moczu pacjenta C (dzień trzeci po operacji) nakładana na kolumnę; 2-3: Frakcje 1-2 z kolumny; 4: M; 4-14: Frakcje 3-14 z kolumny; 15: Próbkę supernatantu moczu pacjenta C (dzień trzeci po operacji) nakładana na kolumnę.
30

Fig. 6 przedstawia wpływ pojemnika, w którym przetrzymywano mocz, na skład białek w próbce. Porównanie moczu pełnego inkubowanego przez godzinę w pojemniku, do elementów 35 przyczepionych do ścianek pojemnika. Sygnał pochodził od reszt aromatycznych zawartych w aminokwasach. Rejestracja sygnału przez aparat firmy Bio-Rad ChemiDoc™ MP. A: Zawartość

poszczególnych studzienek: 1-2: Próbkę ze ścianek pojemników, do których wstępnie zbierano mocz; 3: M; 4: 1TK; 5: 1TR; 6: 1TS; 7: 1TN; 8: 1TSp; 9: 2TK; 10: 2TR; 11: 2TS; 12: 2TN; 13: 2TSp; 14: 3TK; 15: Pacjent C, mocz z 4 dnia po operacji; B: Zawartość poszczególnych studzienek: 1: 3TR; 2: 3TS; 3: 3TN; 4: M; 5: 3TSp; 6: 4TK; 7: 4TR; 8: 4TS; 9: 4TN; 10: 4TNSp; 11: 5TK; 12: 5TR; 13: 5TS; 14: 5TN; 15: 5TSp; C: Zawartość poszczególnych studzienek: 1: M; 2: 1ŚK; 3: 1ŚR; 4: 1ŚS; 5: 1ŚN; 6: 1ŚSp; 7: 2ŚK; 8: 2ŚR; 9: 2ŚS; 10: 2ŚN; 11: 2ŚSp; 12: 5ŚK; 13: 5ŚR; 14: 5ŚS; 15: Pacjent C, mocz z 4 dnia po operacji; D: Zawartość poszczególnych studzienek: 1: 3ŚK; 2: M; 3: 3ŚR; 4: 3ŚS; 5: 3ŚN; 6: 3ŚSp; 7: 4ŚK; 8: 4ŚR; 9: 4ŚS; 10: 4ŚN; 11: 4ŚSp; 12: 5ŚN; 13: 5ŚSp; 14: Próbkę ze ścianki pojemnika, do którego wstępnie zbierano mocz; 15: Pacjent C, mocz z 4 dnia po operacji; Oznaczenia 1 – Niesterylny pojemnik na mocz (plastikowy); 2 – Sterylny pojemnik na mocz (plastikowy); 3 – Sterylny pojemnik na mocz (szklany); 4 – Eppendorf, 5 ml; 5 – Eppendorf typu low bind, 5 ml; T – próbka moczu pełnego; Ś – próbka pobrana z wewnętrznych ścianek pojemnika za pomocą patyczka higienicznego; K – pojemnik kontrolny; R – dwukrotne rozcieńczenie próbki; S – próbka z 1% roztworem SDS; N – pokrycie wewnętrznej powierzchni pojemnika nablyszczaczem; Sp – pokrycie zewnętrznej powierzchni pojemnika warstwą preparatu anty-elektrostatycznego;

PRZYKŁADY

Przykład 1 Analiza próbki moczu pacjentów po operacji przeszczepu nerki w kierunku obecności przeciwciał IgG

Przykładowa analiza próbki moczu wykonywana sposobem według wynalazku obejmuje:

- a) przygotowanie próbki moczu
 - pobieranie moczu od pacjenta zgodnie ze standardową procedurą (odnośnik literaturowy nr (2))
 - mrożenie próbki w -20°C (W przypadku przechowywania próbek dłużej niż przez 16 godz. (odnośnik literaturowy nr (1))
 - transport do laboratorium
 - rozmrożenie w temperaturze pokojowej ($\sim 23^{\circ}\text{C}$)
 - zawieszanie próbki moczu przez intensywne pipetowania lub mieszanie z wykorzystaniem Vortexu
 - dodanie do próbki moczu buforu Laemmli'ego (buforu obciążającego), tak by w próbce znajdowało się:
 - 2% SDS
 - 10% glicerol
 - 5% β -merkaptioetanol

- 0,002% błękit bromofenolu
- 0,125 M Tris-HCl
- pH 6,8
- zagotowanie próbki w temperaturze 95°C przez 2 min
- 5 – nałożenie 10 µl próbki na gradientowy 4-15% żel poliakrylamidowy
- SDS-PAGE w buforze 1x Tris-glicyna przez 30 min przy stałym natężeniu 40 mA/żel
- około 2 min po rozpoczęciu elektroforezy, gdy białka z próbki znajdują się w żelu, zatrzymanie procedury i usunięcie nadmiaru soli obecnej w studzienkach przez odplukanie.

10

b) analizę zmian poziomu przeciwciał IgG w próbce moczu z wykorzystaniem metody Western Blot:

- transfer półsuchy z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową przy użyciu buforu (Tris 96 mM, Glicyna 78 mM, SDS 0,075% (m/v), Metanol 40% (v/v)) do transferu przez 1 h przy napięciu 10V,
- 15 – blokowanie membrany w 10% (m/v) roztworze odłuszczonego mleka rozpuszczonego w PBST (bufor PBS o pH 7,4 z 0,1% (v/v) TWEEN® 20 (CAS# 9005-64-5)) przez 1 h
- zdekantowanie roztworu mleka
- 20 – inkubacja w 5% (m/v) roztworze mleka w PBST przez 2 h z przeciwciałami anti-IgG w stężeniu 1:5000
- dekantacja niezwiązanych przeciwciał i mleka za pomocą buforu PBST (5 razy po 5 min)
- usunięcie TWEENu za pomocą buforu PBS (3 razy po 5 min)
- 25 – wywoływanie z użyciem odczynnika do chemiluminescencji i kamery CCD.

30 Wyniki analiz próbek moczu pochodzących od pacjentów po przeszczepie nerki pokazują poziom przeciwciał z grupy IgG na przestrzeni dni. Na podstawie analizy zmian poziomu przeciwciał (reprezentowanych przez prążek o masie ok 52 kDa- ciężki łańcuch przeciwciał IgG) stwierdza się wzrost poziomu przeciwciał po przeszczepie, co można tłumaczyć reakcją immunologiczną organizmu biorcy. Poziom przeciwciał osiąga maksimum około trzeciego-piątego dnia, a następnie zaczyna spadać, co ewidentnie ma związek z rozpoczęciem terapii immunosupresantami zapobiegającej odrzuceniu przeszczepu.

35 **Przykład 2 Analiza próbki moczu pacjentów po operacji przeszczepu nerki w kierunku obecności komponentów C3**

Przykładowa analiza próbki moczu wykonywana sposobem według wynalazku obejmuje:

- c) przygotowanie próbki moczu;
- pobieranie moczu od pacjenta zgodnie ze standardową procedurą (odnośnik literaturowy nr (2))
 - mrożenie próbki w -20°C (W przypadku przechowywania próbek dłużej niż przez 16 godz. (odnośnik literaturowy nr (1)))
 - transport do laboratorium
 - rozmrożenie w temperaturze pokojowej ($\sim 23^{\circ}\text{C}$)
 - zawieszanie próbki moczu przez intensywne pipetowania lub mieszanie z wykorzystaniem Vortexu
 - dodanie do próbki moczu buforu Laemmli'ego (buforu obciążającego), tak by w próbce znajdowało się:
 - 2% SDS
 - 10% glicerol
 - 5% β -merkaptoetanol
 - 0,002% błękit bromofenolu
 - 0,125 M Tris-HCl
 - pH 6,8
 - zagotowanie próbki w temperaturze 95°C przez 2 min
 - nałożenie 10 μl próbki na gradientowy 4-15% żel poliakrylamidowy
 - SDS-PAGE w buforze 1x Tris-glicyna przez 30 min przy stałym natężeniu 40 mA/żel.
 - około 2 min po rozpoczęciu elektroforezy, gdy białka z próbki znajdują się w żelu, zatrzymanie procedury i usunięcie nadmiaru soli obecnej w studzienkach przez odpłukanie.
- d) analizę zmian poziomu komponentu C3 w próbce moczu z wykorzystaniem metody Western Blot;
- transfer półsuchy z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową przy użyciu buforu (Tris 96 mM, Glicyna 78 mM, SDS 0,075% (m/v), Metanol 40% (v/v)) do transferu przez 1 h przy napięciu 10V.
 - blokowanie membrany w 10% (m/v) roztworze odłuszczonego mleka rozpuszczonego w PBST (bufor PBS o pH 7,4 z 0,1% (v/v) TWEEN® 20 (CAS# 9005-64-5)) przez 1 h
 - inkubacja w 5% (m/v) roztworu mleka w PBST przez noc z przeciwciałami anti-C3 w stężeniu 1:1000
 - dekantację niezwiązanych przeciwciał i mleka za pomocą buforu PBST (5 razy po 5 min)

- inkubację w 5% (m/v) roztworze odłuszczonego mleka w PBST przez 3 h z drugorzędowymi przeciwciałami anti-mouse w stężeniu 1:5000
 - dekantację niezwiązanych przeciwciał i mleka za pomocą buforu PBST (5 razy po 5 min)
- 5
- usunięcie TWEENu za pomocą buforu PBS (3 razy po 5 min)
 - wywoływanie z użyciem odczynnika do chemiluminescencji i kamery CCD.

Przykład 3 Badanie skuteczności sposobu dla różnych warunków przechowywania próbki.

10 Dla sprawdzenia jak czynniki zewnętrzne mogą wpływać na oznaczenie zbadano różne warianty postępowania z próbką, wprowadzając modyfikacje w podstawowej procedurze. Zbadano mocz pochodzący z grupy kontrolnej obejmującej pięć osób. Wzięto pod uwagę następujące czynniki:

a) Temperaturę w jakiej przechowywano próbkę:

- 15
- 1) -20 °C,
 - 2) 4 °C,
 - 3) 23 °C,
 - 4) 37 °C,
 - 5) 60 °C.

20 b) Czas inkubacji próbki:

- 1) bez inkubacji,
- 2) inkubacja przez noc.

c) Sposób postępowania z próbką:

- 25
- 1) badanie zawiesiny moczu,
 - 2) badanie moczu po 5 minutowej sedimentacji: pobieranie próbki z dna oraz z powierzchni cieczy,
 - 3) badanie supernatantu i osadu po zwirowaniu przez 5 min 14,000xg,
 - 4) strącanie białek z całej zawiesiny za pomocą kwasu trójchlorooctowego (TCA).

We wszystkich przypadkach poziom IgG w moczu utrzymywał się na podobnym poziomie (Fig. 2) niezależnie od metody przygotowania próbki (z wyłączeniem całonocnej inkubacji w 60°C). Pomiar jest stabilny niezależnie od sposobu przechowywania próbki, co daje pewność, iż zmiana poziomu IgG w przypadku próbek od pacjentów jest wywołana reakcją immunologiczną organizmu, a nie artefaktem preparatyki.

Przykładowe wyniki analiz ogólnego poziomu przeciwciał IgG w moczu pacjentów, wykonane sposobem według wynalazku przedstawiono na Figurze 3.

35

Przykład 4 Określenie w jakich formach rozpuszczalnych mogą występować białka obecne w moczu.

Dla wyjaśnienia faktu z czym związany jest wzrost poziomu IgG sprawdzono czy białko to tworzy kompleksy z innymi białkami obecnymi w moczu. Wykorzystano do tego kolumnę typu Size Exclusion, rozdzielającą białka na podstawie ich masy. Następnie przeprowadzono detekcję za pomocą techniki Western Blot, w sposób analogiczny do poprzednich próbek.

Przykładowa analiza próbki moczu obejmowała:

- a) przygotowanie próbki moczu;
 - pobieranie moczu od pacjenta zgodnie ze standardową procedurą (odnośnik literaturowy nr (2))
 - mrożenie próbki w -20°C (W przypadku przechowywania próbek dłużej niż przez 16 godz. (odnośnik literaturowy nr (1)))
 - transport do laboratorium
 - rozmrożenie w temperaturze pokojowej ($\sim 23^{\circ}\text{C}$)
- b) rozdział chromatograficzny na kolumnie
 - wirowanie próbki moczu przez 5 min przy 30 tys. x g
 - nałożenie 1 ml próbki na kolumnę i zbieranie frakcji o objętości 1 ml
 - wytrącanie białek za pomocą TCA
 - zawieszenie osadu za pomocą buforu Laemmli'ego (buforu obciążającego), o składzie:
 - 2% SDS
 - 10% glicerol
 - 5% β -merkaptotanol
 - 0,002% błękit bromofenolu
 - 0,125 M Tris-HCl
 - pH 6,8
 - zagotowanie próbki w temperaturze 95°C przez 2 min
 - nałożenie 10 μl próbki na gradientowy 4-15% żel poliakrylamidowy
 - SDS-PAGE w buforze 1x Tris-glicyna przez 30 min przy stałym natężeniu 40 mA/żel
 - około 2 min po rozpoczęciu elektroforezy, gdy białka z próbki znajdują się w żelu, zatrzymanie procedury i usunięcie nadmiaru soli obecnej w studzienkach.
- c) analizę zmian poziomu przeciwciał IgG w próbce moczu z wykorzystaniem metody Western Blot;
 - transfer półsuchy z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową przy użyciu buforu (Tris 96 mM, Glicyna 78 mM, SDS 0,075% (m/v), Metanol 40% (v/v)) do transferu przez 1 h przy napięciu 10V.

- blokowanie membrany w 10% (m/v) roztworze odłuszczonego mleka rozpuszczonego w PBST (bufor PBS o pH 7,4 z 0,1% (v/v) TWEEN® 20 (CAS# 9005-64-5)) przez noc
- zdekantowanie mleka
- 5 – inkubację w 5% (m/v) roztworze mleka w PBST przez 2 h z przeciwciałami anti-IgG w stężeniu 1:5000
- dekantację niezwiązanych przeciwciał i mleka za pomocą buforu PBST (5 razy po 5 min)
- usunięcie TWEENu za pomocą buforu PBS (3 razy po 5 min)
- 10 – wywoływanie z użyciem odczynnika do chemiluminescencji i kamery CCD.
- d) analizę zmian poziomu komponentu C3 w próbce moczu z wykorzystaniem metody Western Blot;
- transfer półsuchy z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową przy użyciu buforu (Tris 96 mM, Glicyna 78 mM, SDS 0,075% (m/v), Metanol 40% (v/v))
- 15 do transferu przez 1 h przy napięciu 10V.
- blokowanie membrany w 10% (m/v) roztworze odłuszczonego mleka rozpuszczonego w PBST (bufor PBS o pH 7,4 z 0,1% (v/v) TWEEN® 20 (CAS# 9005-64-5)) przez godzinę
- inkubację w 5% (m/v) roztworu mleka w PBST przez noc z przeciwciałami anti-C3 w
- 20 stężeniu 1:1000
- dekantację niezwiązanych przeciwciał i mleka za pomocą buforu PBST (5 razy po 5 min)
- inkubację w 5% (m/v) roztworze odłuszczonego mleka w PBST przez 3 h z drugorzędowymi przeciwciałami anti-mouse w stężeniu 1:5000
- 25 – dekantację niezwiązanych przeciwciał i mleka za pomocą buforu PBST (5 razy po 5 min)
- usunięcie TWEENu za pomocą buforu PBS (3 razy po 5 min)
- wywoływanie z użyciem odczynnika do chemiluminescencji i kamery CCD

Analiza frakcji z kolumn pokazuje, że komponenty C3 oraz przeciwciała IgG są obecne w tych

30 samych frakcjach. Co oznacza, że oba białka mogą znajdować się w kompleksie o takiej samej masie. Komponent C3 jest białkiem będącym elementem układu dopełniacza, czyli szlaku biochemicznego między innymi odpowiadającego za immunologiczny odrzut przeszczepu. Występuje również korelacja między zmianami poziomu przeciwciał IgG oraz komponentów C3 w kolejnych dniach po operacji, co sugeruje, że IgG i C3 tworzą kompleks. To z kolei prowadzi

35 do wniosku, że spadek poziomu przeciwciał IgG w końcowych dniach i przyjęcie się przeszczepu są ze sobą powiązane, dzięki czemu wykorzystywana metoda daje poprawne

wyniki. Jak widać na Figurze 1 oba wyżej wymienione białka mają tendencję do agregacji i wytrącania się z roztworu. Dlatego też stosowanie moczu pełnego jest uzasadnione.

Przykład 5 Określenie wpływu pojemnika na proteom obecny moczu

- 5 a) Pobieranie próbki
- Przygotowanie pojemników do pobierania moczu. Pokrycie wewnętrznej powierzchni warstwą nablyszczacza oraz zewnętrznej powierzchni warstwą preparatu anty-elektrostatycznego
 - Pobranie moczu zgodnie ze standardową procedurą (3 osoby płci męskiej w wieku 25-10 27 lat)
 - Zmieszanie równych ilości moczu razem
 - Przygotowanie po 5 sztuk następujących pojemników:
 1. Niesterylny pojemnik na mocz (plastikowy)
 2. Sterylny pojemnik na mocz (plastikowy)
 - 15 3. Sterylny pojemnik na mocz (szklany)
 4. Probówka typu „Eppendorf”, 5 ml
 5. Probówka typu „Eppendorf low bind”, 5 ml
 - Nadanie pojemnikom oznaczeń K, R, S, N, Sp i wykonanie na nich następujących procedur:
 - 20 1. K – pojemnik kontrolny
 2. R – dodanie 2 ml miliQ
 3. N – pokrycie wewnętrznej powierzchni pojemnika nablyszczaczem
 4. Sp – pokrycie zewnętrznej powierzchni pojemnika warstwą preparatu anty-elektrostatycznego
 - 25 – Przeniesienie po 4,5 ml zmieszanego moczu do nowych pojemników
 - Dodanie do pojemników oznaczonych „S” 500 µl 10% (v/v) roztworu SDS
 - Inkubacja próbki w temperaturze pokojowej przez 1 h, co jakiś czas delikatnie mieszając
 - Usunięcie cieczy za pomocą pipety
 - Zanurzenie patyczka higienicznego z wacikiem w buforze Leammli’ego
 - 30 – Zebranie za pomocą wacika białek przyczepionych do ścianek (z wyżej opisanych 25 pojemników oraz z trzech pierwszych pojemników, do których wstępnie pobierano mocz)
 - Przeniesienie wacika do probówkę typu eppendorf
 - Oddzielenie roztworu od wacika za pomocą wirowania
 - Zebranie próbki w buforze do nowej probówki
 - 35 – Zagotowanie próbki w temperaturze 95°C przez 2 min
 - Dalsza procedura analogicznie do przedstawionej w przykładzie 1.

Porównanie proteomu próbki z moczu pełnego oraz próbki pobranej ze ścianek pojemnika (Fig. 6), ujawniło różny wzór białek na żelu. Oznacza to, że doszło do osadzania się części białek na wewnętrznej powierzchni naczynia. Efekt ten jest najmniejszy w przypadku szklanego pojemnika oraz obecności w próbce moczu pełnego 1% (v/v) roztworu SDS.

5

Literatura

1. Thongboonkerd V. Practical Points in Urinary Proteomics. *Journal of Proteome Research*. 2007, 6(10), 3881-3890.
2. Delanghe J., Speeckaert, M. Preanalytical requirements of urinalysis. *Biochemia Medica*. 2014, 24(1), 89-104.
3. Decramer S. de Peredo, A. G., Breuil, B., Mischak, H., Monsarrat, B., Bascands, J. -, & Schanstra, J. P. Urine in clinical proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2008, 7(10), 1850-1862.
4. Thongboonkerd V. & Saetun, P. Bacterial overgrowth affects urinary proteome analysis: Recommendation for centrifugation, temperature, duration, and the use of preservatives during sample collection. *Journal of Proteome Research*. 2007, 6(11), 4173-4181.
5. Bakun M. Niemczyk, M., Domanski, D., Jazwiec, R., Perzanowska, A., Niemczyk, S., Dadlez, M. Urine proteome of autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Clinical Proteomics*. 2012, 9(1).
6. Rodriguez-del Valle M. Quakyi, I. A., Amuesi, J., Quaye, J. T., Nkrumah, F. K., & Taylor, D. W. Detection of antigens and antibodies in the urine of humans with plasmodium falciparum malaria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991, 29(6), 1236-1242.
7. [Online] <http://www.uniprot.org/uniprot/P02768>.
8. [Online] <http://www.uniprot.org/uniprot/P01024>.
9. [Online] <http://emedicine.medscape.com/article/136897-overview>.