

# Imunološki eseji za određivanje citokina u biološkom materijalu

---

Nikić, Luka

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:562113>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Luka Nikić**

0058214940

**IMUNOLOŠKI ESEJI ZA ODREĐIVANJE CITOKINA U**  
**BIOLOŠKOM MATERIJALU**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Analitička kemija

**Mentor:** Prof. dr. sc. Ivone Jakaša

**Zagreb, 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Zavod za Kemiju i Biokemiju**  
**Laboratorij za Analitičku Kemiju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

### IMUNOLOŠKI ESEJI ZA ODREĐIVANJE CITOKINA U BIOLOŠKOM MATERIJALU

**Luka Nikić, 0058214940**

**Sažetak:** Imunološki eseji su važan alat u istraživanju različitih bolesti ili kliničkoj praksi gdje se koriste u dijagnostičke, ali i prognostičke svrhe. Enzimsko vezani imunoapsorbirajući esej (ELISA) kao pouzdana i validirana singleplex tehnika kojom se mogu određivati pojedini citokini, koristi se kao „zlatni standard“. Međutim, zbog potrebe za boljim razumijevanjem kompleksnih bolesti, potaknut je razvoj eseja koje karakterizira istovremeno određivanje većeg broja različitih citokina unutar istog uzorka, tzv. multiplex eseja. Cilj ovog rada je prikaz i usporedba najčešćih imunoloških tehnika za određivanje većeg broja citokina u istom uzorku kao biomarkera povezanih s multifaktorskim bolestima. Iako multiplex metode imaju veću osjetljivost, točnost, preciznost i nižu granicu detekcije zbog principa na kojem radi sustav za mjerenje citokina, problemi koji se javljaju kao na primjer križna reaktivnost ili nespecifična vezanja, za posljedicu još uvijek imaju njihovu sporadičnu primjenu u kliničkoj praksi zbog nemogućnosti udovoljavanja strogim zahtjevima validacije.

**Ključne riječi:** citokini, ELISA, imunoesej, interferenti, multiplex

**Rad sadrži:** 22 stranice, 10 slika, 0 tablica, 33 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Ivone Jakaša

**Pomoć pri izradi:** Ines Peremin, mag. ing. bioproc.

**Datum obrane:** 15. srpnja 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Bachelor thesis**

**University of Zagreb**  
**Faculty of Chemistry and Biochemistry**  
**University undergraduate study of Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory of Analytical Chemistry**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

### **IMMUNOASSAYS FOR CYTOKINE PROFILING IN BIOLOGICAL MATERIAL**

**Luka Nikić, 0058214940**

**Abstract:** Immunoassays are an important tool in the research of different diseases or in clinical practice for diagnostic or prognostic purposes. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is a reliable and validated singleplex technique capable of measuring individual cytokine levels and is used as the gold standard. However, the need for a better understanding of the complex nature of diseases lead to the development of assays characterized by the simultaneous measurement of numerous different cytokines within the same sample, the so-called multiplex methods. The goal of this thesis is to present and compare the most common immunological assays for the analysis of proteins (i.e., cytokines) associated with multifactorial diseases. Although such multiplex assays have higher sensitivity, accuracy, precision, and lower limit of detection due to the principle on which the protein measurement system works, at present challenges related to e.g., cross-reactivity or non-specific bonding, are the key reason these assays are intermittently used due to inability to pass rigorous validation procedure in clinical settings.

**Key words:** cytokines, ELISA, immunoassay, interferents, multiplex

**Thesis contains:** 22 pages, 10 figures, 0 tables, 33 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD. Ivone Jakaša, Full Professor

**Technical support and assistance:** Ines Peremin, MSc.

**Defence date:** July 15<sup>th</sup> 2021

# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1	CITOKINI I NJIHOVI RECEPTORI.....	2
2.2	METODE DETEKCIJE .....	3
2.3	SINGLEPLEX I MULTIPLEX ESEJI .....	4
	<i>2.3.1 Protutijelo-antigen interakcije</i> .....	4
	<i>2.3.2 ELISA</i> .....	5
	<i>2.3.3 Planarni multiplex imunoesej</i> .....	8
	<i>2.3.4 Imunoesej temeljen na mikroznima</i> .....	10
2.4	INTERFERENCIJE KOD IMUNOESEJA.....	13
2.5	USPOREDBA SINGLEPLEX I MULTIPLEX ESEJA .....	16
<b>3</b>	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>POPIS LITERATURE</b> .....	<b>20</b>

# 1 UVOD

Zadaća imunosnog sustava je zaštita organizma od vanjskih faktora kao što su virusi i bakterije, koji se još nazivaju antigeni. U svrhu odvijanja normalne imunološke reakcije, stanice imunosnog sustava, u koje između ostalih pripadaju mastociti, intraepitelni limfociti te T i B limfociti, međusobno komuniciraju preko signalnih molekula. Primjer takvih signalnih molekula su citokini, mali topljivi proteini mase 5-20 kDa, koje stanice imunosnog sustava izlučuju u svoju okolinu (Zhang i An, 2007; Charles i sur., 2014).

Iako ne postoji jedinstveni dogovor oko podjele citokina, najčešće su svrstani u skupine s obzirom na njihovu trodimenzijsku strukturu ili prema njihovoj funkciji u organizmu. Prema tome, jedna od podjela prema funkciji je na tzv. protu-upalne i pro-upalne citokine. Pro-upalni citokini predstavljaju skupinu signalnih proteina koji potiču upalnu reakciju u prisutnosti antigena. Za razliku od pro-upalnih, protu-upalni citokini imaju suprotan učinak, odnosno reguliraju odgovor pro-upalnih citokina kod upalnih procesa (Charles i sur., 2014; Dembic, 2015; Pikec, 2020).

Razina citokina u biološkim uzorcima može dati vrijedne informacije o metaboličkim i drugim fiziološkim procesima kod oboljenja. Citokini se uglavnom određuju u međustaničnim tekućinama te krvi i derivatima krvi kao što su serum i plazma. Citokini imaju ulogu biomarkera u multifaktorskim oboljenjima poput karcinoma, autoimunih i neurodegenerativnih bolesti te je za karakterizaciju takvih stanja potrebna informacija o većem broju citokina u istom uzorku (Tighe i sur., 2015). Za analizu citokina u biološkim uzorcima u najvećem broju slučajeva koristi se enzimsko vezani imuno-apsorbirajući esej (ELISA) kao pouzdana i validirana tehnika koja omogućava određivanje pojedinačnih citokina. Međutim, potreba za razumijevanjem složenih multifaktorskih oboljenja potaknula je razvoj tehnika koje karakterizira istovremeno određivanje većeg broja različitih citokina u istom uzorku (tzv. multiplex tehnike) (Tighe i sur., 2015). U kliničkoj uporabi gotovo nema tehnika za detekciju i kvantifikaciju većeg broja biomarkera u istom uzorku. Razlog tome je što većina tih tehnika nije validirana za uporabu u klinici (Ellington i sur., 2010).

Stoga je cilj ovog rada prikazati najčešće imunološke tehnike za određivanje citokina kao biomarkera, koje se koriste i dodatno razvijaju u istraživačke svrhe s ciljem njihova uvođenja u kliničku praksu. Napretkom tehnologije postoje vrlo optimistična predviđanja da bi se tijekom vremena i ove multiplex tehnike mogle validirati za kliničku uporabu te bi bile od velike pomoći u primjeni pravovremene i personalizirane terapije.

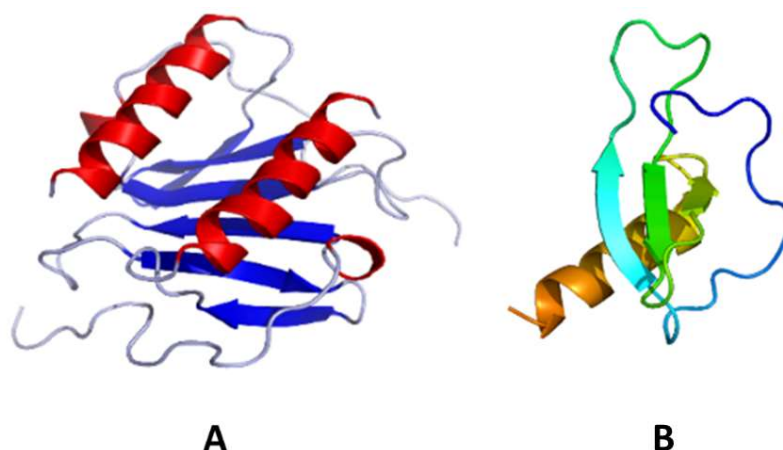
## 2 TEORIJSKI DIO

### 2.1 Citokini i njihovi receptori

Citokini su mali cirkulirajući topljivi proteini koji se nalaze u svim organima, a koji imaju ulogu posrednika u imunološkom odgovoru. Mase citokina kreću se u rasponu od 5 do 20 kDa te ih stanice imunskog sustava izlučuju u svoju okolinu (SinoBiological, c). Funkcija citokina je komunikacija između stanica imunskog sustava i različitih tkiva, koja omogućava regulaciju fizioloških procesa kao što su metabolizam, diferencijacija i rast stanica te drugi procesi (Dembic, 2015). Komunikacija između imunskih stanica posredovana citokinima odvija se preko receptora koji se mogu nalaziti unutar stanice ili na površini stanice. Molekula koja se veže na receptor još se naziva i ligand. Uslijed interakcije citokina s receptorom, u stanici se inicira kaskada enzimskih reakcija koja rezultira regulacijom prethodno spomenutih fizioloških procesa (Dembic, 2015; Pikec, 2020; SinoBiological, a).

Iako ne postoji jedinstveni dogovor oko podjele citokina u skupine, isti se najčešće razvrstavaju u skupine prema njihovoj strukturi ili njihovoj funkciji u organizmu. Na primjer, prema svojim strukturnim karakteristikama citokini su podijeljeni u skupinu tzv. interleukina (IL), transformirajućeg čimbenika rasta (TNF, eng. *transforming growth factor*), čimbenika nekroze tumora (TGF, eng. *tumor necrosis factor*), kemokina, ali i drugih skupina. Kao primjer podjele prema funkciji možemo navesti pro-upalne skupinu u koju, između ostalih, pripadaju i citokini iz IL-1 familije, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-18 te protu-upalnu skupinu citokina kao što su npr. antagonist receptora za interleukin 1 (IL-1RA, eng. *interleukin-1 receptor antagonist*), zatim IL-4, IL-6 i IL-13 (SinoBiological, b; Dembic, 2015; Pikec, 2020).

Veliki broj citokina međusobno je sličan po svojoj strukturi i redosljedu aminokiselina, a neki čak stupaju u interakcije s istim receptorima. Slika 1 prikazuje strukture citokina IL-18 i CCL17 koji pripadaju različitim skupinama, a iz kojih su vidljive sličnosti između relativne blizine i gotovo okomitog odnosa alfa-uzvojnica (crveno i narančasto) i beta-ploča (plavo, tirkizno, zeleno i žuto) (SinoBiological, b; Dembic, 2015).



**Slika 1** Prikaz citokina: interleukin IL-8 (A) te kemokin CCL17 (B) (Herati, 2006; Emw, 2009).

Receptori su proteini koji se nalaze unutar stanica ili na površini stanica. Vežanje liganda (citokina) dovodi do aktivacije receptora, što posredno inicira biokemijske procese u stanici kao što je promjena metabolizma stanice. Samo vežanje citokina za receptore na površini stanice događa se preko izvanstaničnog dijela receptora uronjenog u fosfolipidni dvosloj (membranu) stanice. Receptori se dijele u nekoliko skupina na temelju homologije (sličnosti) redoslijeda aminokiselina, odnosno strukturnih obilježja. Neke od tih skupina su: receptori tipa I, tipa II, kemokinski receptori, TNF receptori, TGF- $\beta$  receptori i superfamilija imunoglobulina (SinoBiological, b; Brooks i sur., 2017; Pikec, 2020).

## 2.2 Metode detekcije

Određivanje topljivih citokina i drugih analita u krvi, serumu ili plazmi te u međustaničnim tekućinama dobiva na sve većoj važnosti u proučavanju i kontroli mnogih bolesti. Kao rezultat toga nastala je sve veća potražnja za brzim, točnim i isplativim metodama takvih analiza u kliničkim i istraživačkim laboratorijima (Elshal i McCoy, 2006). Najvažnije metode određivanja citokina su imunološke metode i metode temeljene na lančanoj reakciji polimerazom (qRT-PCR, eng. *quantitative real-time polymerase chain reaction*). Razvojem tehnologije, afinitetna kromatografija u sprezi sa spektrometrijom masa također dobiva sve više na važnosti (Kupcova i sur., 2017).

Imunološke metode koje se koriste u kliničkoj praksi uglavnom se temelje na mjerenju jednog analita u uzorku (poznate pod široko korištenim nazivom singleplex imunoeseji) s naglaskom na ultra-osjetljive imunoeseje kao što je primjer određivanje C- reaktivnog proteina



(hsCRP, eng. *high sensitivity C-reactive protein*). U istraživanjima se često koriste i imuno metode koje se temelje na mjerenju više analita u istom uzorku (poznate pod široko korištenim nazivom multiplex imunoeseji), međutim njihova upotreba još nije zaživjela u kliničkoj praksi zbog strogih zahtjeva validacije istih (Kupcova i sur., 2017).

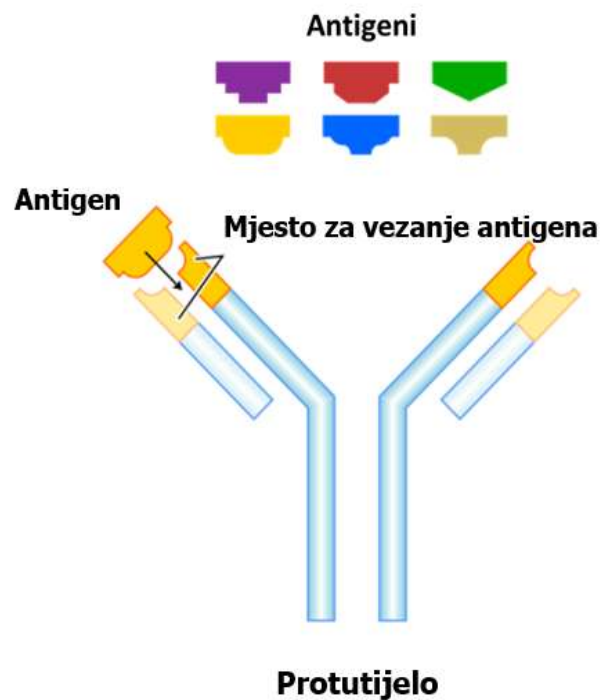
### 2.3 Singleplex i multiplex eseji

Singleplex imunoeseji uzimaju se kao „zlatni standard“ u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi citokina i drugih biomarkera kroz više od pola stoljeća, s velikim brojem imunoeseja dostupnih na dijagnostičkom tržištu (Elshal i McCoy, 2006; Tighe i sur., 2015). Jedan od najzastupljenijih singleplex imunoeseja je enzimski vezani imunoapsorbirajući esej (ELISA, eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) koji je u kliničkoj uporabi (Ellington i sur., 2010). Međutim, kod kompleksnih i višefaktorskih bolesti kao što su karcinom, autoimune i neurodegenerativne bolesti, potrebna je analiza većeg broja biomarkera u dijagnostičke, ali i u prognostičke svrhe radi izbora prikladne terapije, odnosno praćenja učinka terapije (Tighe i sur., 2015). Singleplex i multiplex metode dijele temeljni koncept određivanja proteina, tzv. sendvič koncept (hvatajuće protutijelo – antigen iz uzorka – detekcijsko protutijelo, eng. *capture antibody – antigen – detection antibody*) (Tighe i sur., 2015). Za razliku od singleplex ELISA metoda, multiplex imunoeseji ne zahtijevaju odvijanje enzimske reakcije u analizi citokina i mogu se koristiti i u singleplex formatu, odnosno imaju mogućnost mjerenja i samo jednog citokina (Elshal i McCoy, 2006). S obzirom na format, multiplex imunoeseji su dostupni kao planarni ili suspenzijski eseji (Ellington i sur., 2010). Druga prednost multiplex metoda u odnosu na singleplex metode je što imaju povećanu osjetljivost, točnost, preciznost i nižu granicu detekcije zbog principa na kojem se temelji sustav za mjerenje citokina. Ove prednosti multiplex formata su razlog težnji validacije istoga za klinička ispitivanja (Ellington i sur., 2010; Tighe i sur., 2015).

#### 2.3.1 Protutijelo-antigen interakcije

Princip singleplex i multiplex imunoeseja se temelji na interakcijama protutijela i antigena (Kupcova i sur., 2017). Antigen označava bilo koju molekulu (patogen, toksin, citokin) koja se može vezati na protutijelo specifično za taj antigen. Protutijela su obrambeni proteini imunskog sustava, međusobno slične strukture koja nalikuje obliku slova „Y“. Funkcija protutijela u prisustvu infektivnog antigena u organizmu jest vezanje za taj antigen.

Prilikom vezanja, određenim se mehanizmom infektivnost antigena zaustavi, odnosno spriječi se štetno djelovanje antigena na organizam. Vezanje antigena za protutijelo se događa preko regije na protutijelu po kojoj se sama protutijela razlikuju, a koja je specifična za vezanje antigena (slika 2). Samo vezanje antigena i protutijela događa se preko slabih nekovalentnih interakcija kao što su elektrostatske interakcije, vodikove veze i Van der Waalsove privlačne sile. Postoje brojni tipovi protutijela te svako od njih ima mogućnost vezanja jednog specifičnog ili malog broja različitih antigena (Janeway i sur., 2001).



**Slika 2** Interakcije antigena i protutijela (NHGRI, 2007).

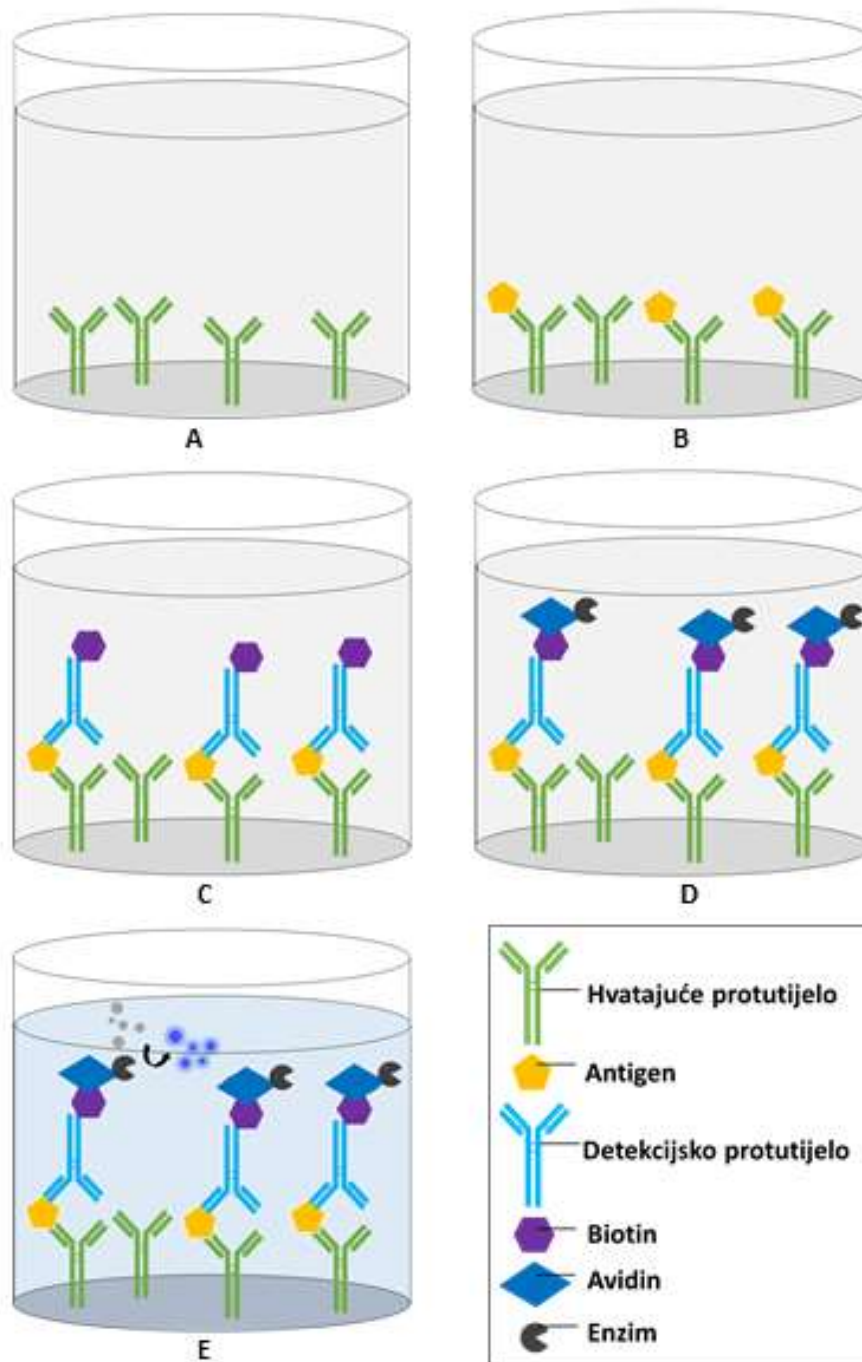
### 2.3.2 ELISA

ELISA je planarni enzimski imunoesej kojim se određuje koncentracija jednog citokina u uzorku. Određivanje citokina temelji se na sustavu proizvodnje signala na principu enzimske reakcije (Elshal i McCoy, 2006).

Postoji nekoliko formata, odnosno izvedbi ELISA s obzirom na mehanizam vezanja protutijela i citokina. Najčešće korištena izvedba metode je tzv. sendvič (eng. *sandwich ELISA*) izvedba te se u nešto manjem obimu koriste direktna, indirektna i kompetitivna izvedba (Bio-Rad Laboratories, a).

Sendvič metoda je nazvana po tome što nastali kompleks nakon vezanja protutijela i citokina izgledom podsjeća na sendvič. Na jedan citokin vezana su dva protutijela sa suprotnih strana, tako da se citokin nalazi u sredini kako je prikazano na slici 3C. Imunoesej se provodi na mikrotitarskoj ploči koja se sastoji od 96 ili 384 jažice. Protutijelo, odnosno hvatajuće protutijelo (eng. *capture antibody*) adsorbirano je na čvrsti nosač, odnosno na unutarnju površinu jažice mikrotitarske ploče (slika 3A). Potom se dodaje uzorak u kojem je prisutan analit, odnosno citokin koji se specifično veže na hvatajuće protutijelo kao na slici 3B, dok se drugi sastojci uzorka neće vezati. U sljedećem se koraku dodaje drugo protutijelo, takozvano detekcijsko protutijelo (eng. *detection antibody*) koje se također specifično veže na citokin (slika 3C). Na detekcijsko protutijelo je obično vezan biotin. Nakon toga se dodaje enzim konjugiran sa avidinom/streptavidinom koji se preko biotina veže na detekcijsko protutijelo (Bio-Rad Laboratories, a; Crowther, 2009).

Avidin i streptavidin su tetramerni proteini koji se sastoje od četiri identične podjedinice te svaka od njih ima mjesto s visokim afinitetom za vezanje biotina što doprinosi osjetljivosti metode. Biotin (vitamin B7) je mala organska molekula koja se kovalentno veže na detekcijsko protutijelo. Slika 3C prikazuje molekulu biotina konjugiranu (kovalentno vezanu) na detekcijsko protutijelo preko kojega će se vezati avidin ili streptavidin koji je konjugiran s enzimom. Dodatkom prikladnog supstrata u jažicu, enzimskom reakcijom dolazi do stvaranja obojenog produkta (signalne molekule, slika 3E) te se obično intenzitet signala, odnosno apsorbancija, može odrediti spektrofotometrijski. Peroksidaza iz hrena (eng. *horseradish peroxidase*) i alkalna fosfataza se najčešće koriste kao enzimi za ELISA. Što je veća koncentracija citokina u uzorku, to će ih se više vezati na hvatajuća protutijela, odnosno to će se više detekcijskog protutijela vezati na vezane citokine te će i apsorbancija biti veća. Koncentracija antigena može se izračunati usporedbom s apsorbancijama standardnih otopina istog antigena (Bio-Rad Laboratories, a; Crowther, 2009).

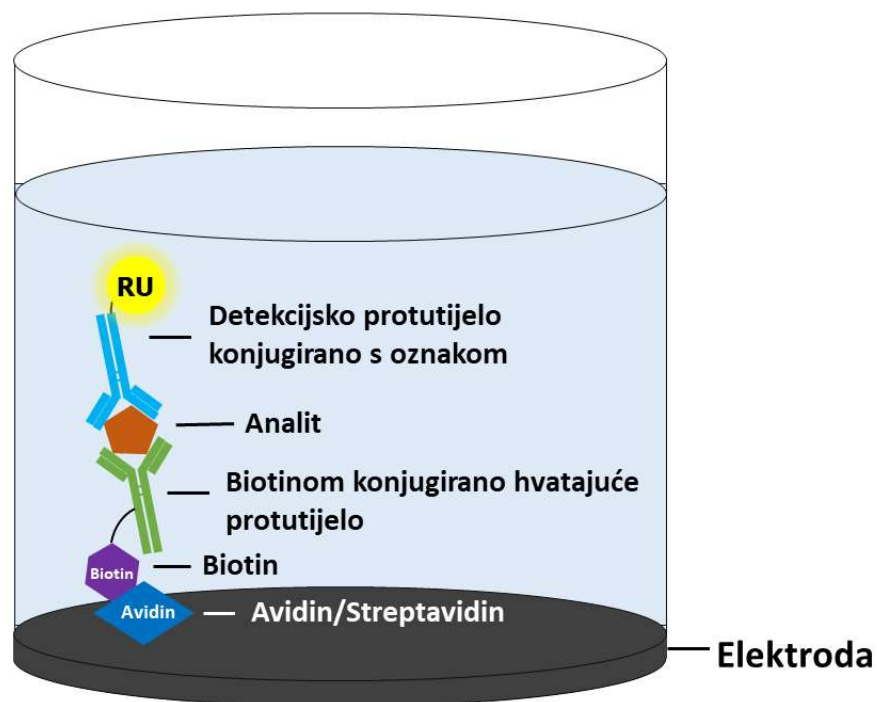


**Slika 3** Ilustracija izvedbe sendvič ELISA; A) adsorpcija hvatajućeg protutijela na jažicu; B) vezanje analita (antigena) na hvatajuće protutijelo; C) vezanje detekcijskog protutijela na antigen; D) vezanje enzima na detekcijsko protutijelo; E) provođenje enzimske reakcije (obojenje otopine).

### 2.3.3 Planarni multiplex imunosej

U multiplex tehnike spadaju planarni i suspenzijski formati koji se temelje na tradicionalnim imunometrijskim principima (Yiğitbaşı, 2012). Planarni multiplex imunosej karakterizira velik broj različitih hvatajućih protutijela imobiliziranih na čvrstoj površini jažice i grupiranih u takozvana „mikromjesta“ (eng. *microspots*). Ovisno o izvedbi mikrotitarske ploče, svaka od jažica može sadržavati od 1 do 10 mikromjesta kao što je prikazano na slici 5. Promjer mikromjesta je do 250  $\mu\text{m}$  te između svakog mikromjesta u jažici postoji diskretni razmak jer svako od mikromjesta sadrži hvatajuće protutijelo specifično za vezanje samo jedne vrste citokina. Drugim riječima, broj različitih citokina koje je moguće odrediti u istoj jažici bit će definiran brojem specifičnih mikromjesta (Ellington i sur., 2010). Sukladno tome, ova metoda isto tako može biti i u singleplex formatu, odnosno može se konfigurirati tako da se mjeri samo jedan citokin. U usporedbi s ELISA, koja je kolorimetrijska metoda s obzirom na način detekcije signala, kod planarnog multiplex imunoseja detekcija se može temeljiti i na elektrokemiluminiscenciji (ECL, eng. *electrochemiluminescence*). ECL je posljedica električnom strujom potaknute oksidacijsko-redukcijske reakcije kompleksa rutenijevog iona ili molekule komercijalno poznate pod imenom SULFO-TAG™ (Meso Scale Discovery™, MSD), prilikom čega dolazi do emisije svjetlosti čiji se intenzitet mjeri u svrhu kvantifikacije citokina prisutnih u uzorku (Leng, 2008; Kupcova i sur., 2017).

Na Slici 4 prikazan je princip vezanja citokina na hvatajuće protutijelo i interakcije s obilježnim detekcijskim protutijelom. Riječ je o sendvič izvedbi sličnoj kao i kod ELISA uz nekoliko razlika. Hvatajuće protutijelo koje je konjugirano s biotinom veže se na avidin prema prethodno objašnjenom avidin/streptavidin-biotin sustavu. Citokin iz uzorka veže se na specifično hvatajuće protutijelo, dok se drugi sastojci uzorka neće vezati. Mikrotitarska ploča kod MSD platforme na dnu jažice sadrži ugljikovu elektrodu (slike 4 i 5). Nakon dodatka detekcijskog protutijela konjugiranog sa signalnom molekulom SULFO-TAG™ ili kompleksom rutenijevog iona (RU), na elektrodu se narine određeni napon. U slučaju da se detekcijsko protutijelo konjugirano sa signalnom molekulom nalazi u neposrednoj blizini površine elektrode, struja će potaknuti spomenutu oksidacijsko-redukcijsku reakciju (slika 4). Reakcija će u konačnici na signalnoj molekuli prouzročiti emisiju svjetla (ECL) koje se može detektirati i kvantificirati prikladnim uređajem (Leng, 2008; Meso Scale Discovery, 2019).



**Slika 4** Ilustracija izvedbe sendvič elektrokemiluminiscentnog imunoeseja (izrađeno prema Meso Scale Discovery, 2019).



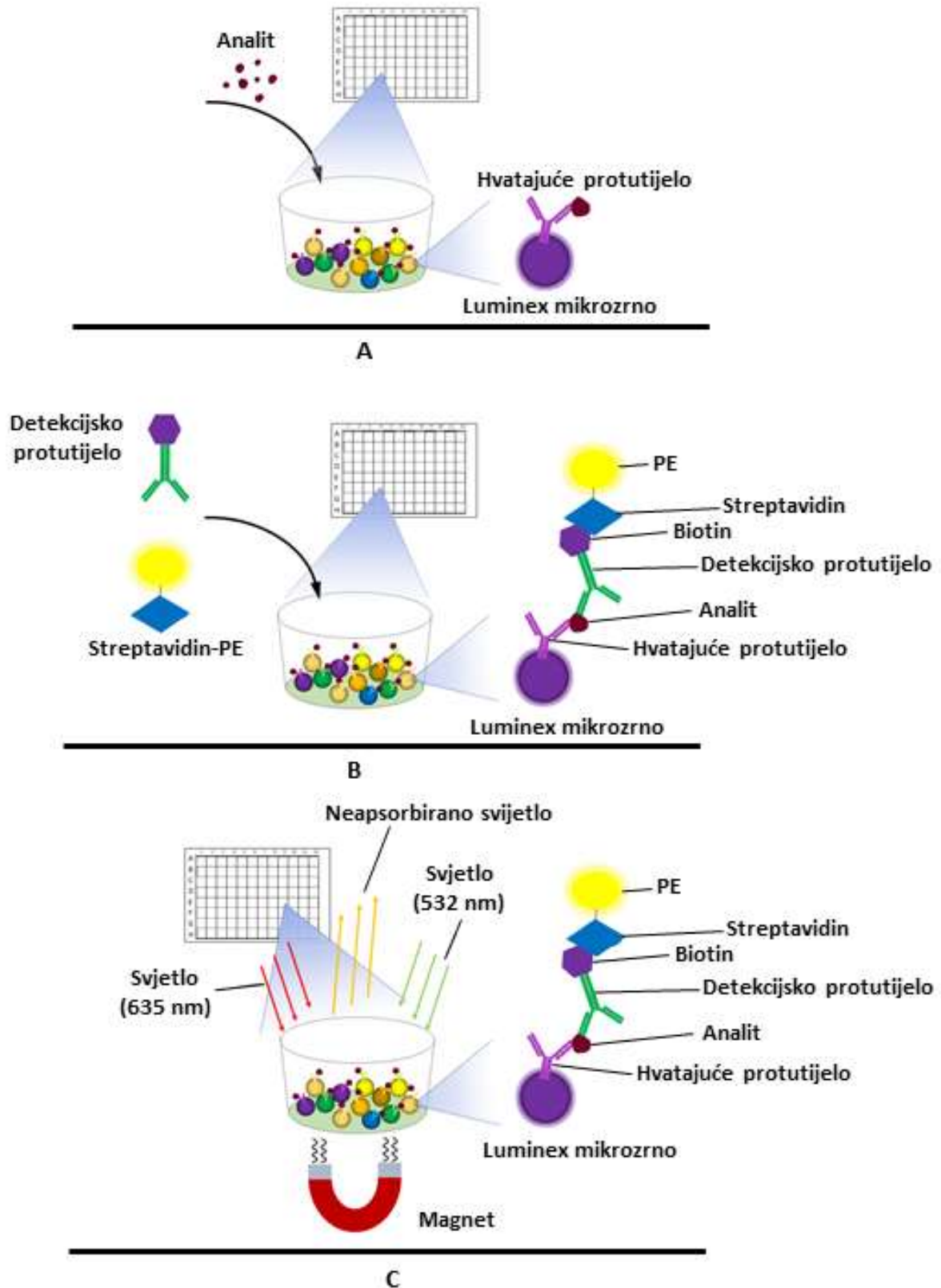
**Slika 5** Ilustracija jažica sa mikromjestima. Mikromjesta su označena brojevima (izrađeno prema Meso Scale Discovery, 2019).

### 2.3.4 Imunoesej temeljen na mikroznima

Za razliku od planarnog imunoeseja, imunoesej temeljen na mikroznima spada u trodimenzijski suspenzijski multiplex imunoesej u kojem se koriste mikrozna sferičnog oblika promjera 5.6  $\mu\text{m}$  koja predstavljaju čvrsti nosač za vezanje hvatajućih protutijela. Kao i kod mikromjesta u planarnoj izvedbi, svako mikrožno obilježeno je velikim brojem istih hvatajućih protutijela specifičnih za vezanje citokina samo jedne vrste. Shodno tome, broj različitih citokina koji se mogu mjeriti u uzorku ovisi o broju jedinstveno obilježenih mikrozna. Još jedna od platformi koja je u fokusu ovog rada, a koja se temelji na prethodno objašnjenom principu je xMAP, proizvođača Luminex. Sustav proizvodnje signala za detekciju i mjerenje citokina kod Luminex imunoeseja baziranog na mikroznima temelji se kao i kod ELISA na apsorpciji svjetla. Razlika je u tome što je na detekcijsko protutijelo vezan pigment, odnosno fluorofor koji apsorbira svjetlost (Ellington i sur., 2010; R&D systems, a).

Sendvič izvedba je kao i kod MSD slična ELISA metodi. Hvatajuća protutijela specifična za vezanje citokina dolaze već vezana za mikrozna. Nakon dodatka uzorka u jažicu, citokini od interesa vežu se na specifična hvatajuća protutijela (slika 6A). Potom se dodaje biotinizirano detekcijsko protutijelo i pigment konjugiran streptavidinom (slika 6B). Na citokin vezan za hvatajuće protutijelo veže se detekcijsko protutijelo, a na detekcijsko protutijelo preko biotina streptavidin konjugiran pigmentom (fikoeritrin, PE). Detekcijsko protutijelo spregnuto s pigmentom može poslužiti za detekciju i kvantifikaciju citokina u uzorku (Yiğitbaşı, 2012).

Postoje dva načina detekcije citokina u uzorku. Prvi način temelji se na principu protočne citometrije pri čemu se svako mikrožno pojedinačno ispituje pomoću dva lasera prilikom prolaska kroz kapilaru. Naime, u svrhu raspoznavanja hvatajućih protutijela spregnutih s mikroznima, mikrozna su iznutra obojena kombinacijom dvije do tri fluorescentne boje u različitim omjerima. Tako će mikrozna koja sadrže jedan tip hvatajućeg protutijela prilikom obasjavanja laserskom zrakom svjetlosti valne duljine 635 nm fluorescirati valnom duljinom specifičnom za omjer udjela tih boja. Riječ je o takozvanom spektralnom otisku koji naposljetku omogućuje raspoznavanje citokina vezanih na površinu mikrozna. Količina prisutnog citokina određuje se pobuđivanjem fluorofora vezanog na detekcijsko protutijelo, zrakom valne duljine 532 nm pri čemu se emitirana fluorescencija detektira pomoću fotomultiplikacijske cijevi. Intenzitet signala direktno je proporcionalna količini vezanog citokina (Dunbar i Hoffmeyer, 2013).



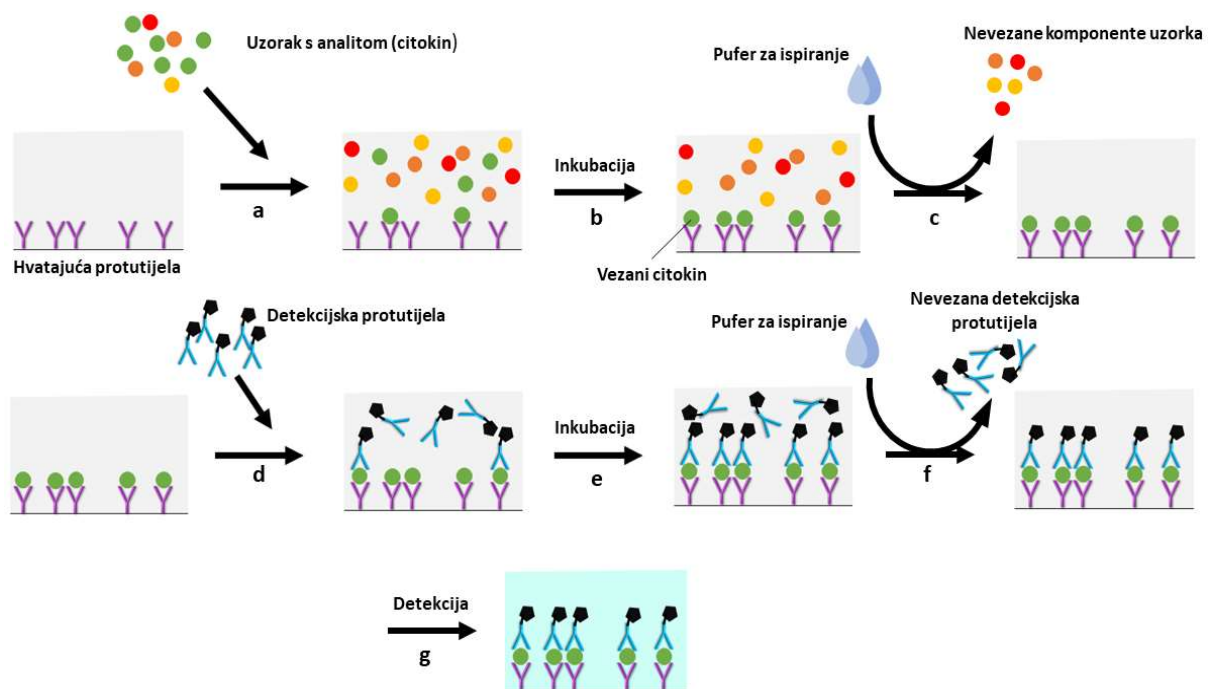
**Slika 6** Ilustracija imunoeseja temeljenog na mikroznima; A) dodavanje uzorka u jažice sa mikroznima; B) dodavanje biotiniziranog detekcijskog protutijela i pigmenta konjugiranog enzimom; C) identifikacija i mjerenje apsorpcije mikrosfera (svjetlom od 635 nm i 532 nm) (izrađeno prema R&D systems, b).



Detekcija citokina u uzorku može se provesti i upotrebom analizatora na principu magnetizma, pri čemu se koriste mikroznna s magnetskim svojstvima. Magnet u analizatoru omogućava raspoređivanje magnetnih mikroznaca u monosloj u komori za snimanje, dok dvije LED diode različitim valnim duljinama svjetla obasjavaju mikroznna (slika 6C). Svjetlost valne duljine koja odgovara crvenom dijelu vidljivog spektra (621-630 nm) pobuđuje fluorescentne boje sadržane u mikroznima, a svjetlost valne duljine koja odgovara zelenom dijelu vidljivog spektra (515 nm) pobuđuje fluorofor vezan na detekcijsko protutijelo (Dunbar i Hoffmeyer, 2013). Analogno prvom načinu detekcije, optički uređaj na temelju prepoznavanja vrste mikroznna i količine pigmenta vezanog na mikroznno neizravno identificira i kvantificira citokin vezan na površinu mikroznna (R&D systems, b).

Prethodno su opisani temeljni principi rada 3 često korištena imunoeseja koji se temelje na različitim platformama, odnosno, metodama detekcije. U nastavku će ukratko biti riječi o nekim specifičnim koracima koji su uključeni u sam tijek pripreme uzorka za mjerenje, a zajednički su svim opisanim metodama.

Kod svakog koraka dodavanja nekog od reagensa, npr. uzorka (slika 7a) ili detekcijskog protutijela (slika 7d) potrebno je provesti korak inkubacije (slike 7b i 7e) nakon kojeg slijedi korak ispiranja (slike 7c i 7f) (Bio-Rad Laboratories, a; Crowther, 2009).



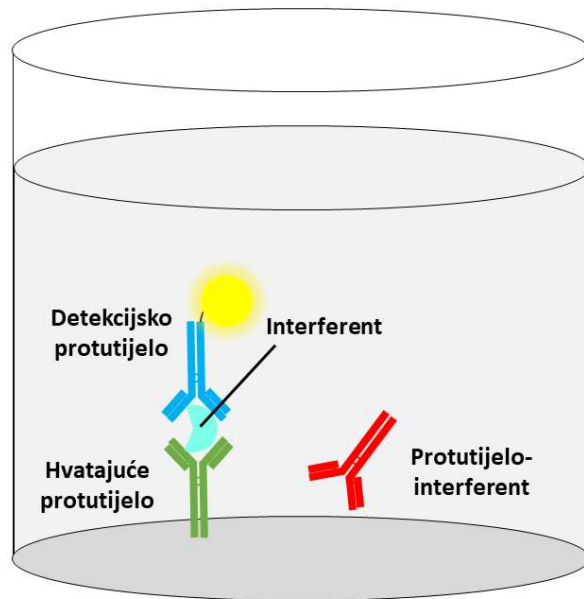
**Slika 7** Ilustracija redoslijeda koraka za provedbu imunoeseja. Crna boja označava ovisno o metodi: enzim ili pigment ili ECL molekulu.

Inkubacija je proces u kojem se određeni sustav (npr. mikrotitarska ploča u koju je dodan određeni volumen uzorka) drži na prikladnoj temperaturi kroz određeni vremenski period. Inkubacija služi kako bi došlo do pravilne interakcije i vezanja (ovisno o kojem se koraku radi): hvatajućih protutijela na dno mikrotitarske ploče ili za mikrozrno, vezanja ciljanog analita za hvatajuće ili detekcijsko protutijelo ili kako bi se provelo uspješno razvijanje obojenja koje proizvodi intenzitet signala proporcionalnog količini antigena. Na primjer, kod ELISA su potrebni određeni temperaturni uvjeti za provedbu enzimske reakcije koji se mogu postići inkubacijom. Ispiranje je jednostavan proces koji služi kako bi se (opet ovisno o kojem se koraku radi): uklonili svi sastojci uzorka koji se nisu vezali za hvatajuće protutijelo (slika 7c) ili uklonila sva detekcijska protutijela koja nisu vezana na „uhvaćene“ citokine (slika 7f) prije samog mjerenja. Ispiranje se radi najčešće nakon inkubacije, tako da se iz jažica prvo ukloni sva prisutna otopina (npr. uzorak) te se dodaje odgovarajući volumen puferne otopine, nakon čega ponovo slijedi nekoliko uzastopnih koraka uklanjanja i dodavanja puferne otopine za ispiranje (Crowther, 2009).

## **2.4 Interferencije kod imunoeseja**

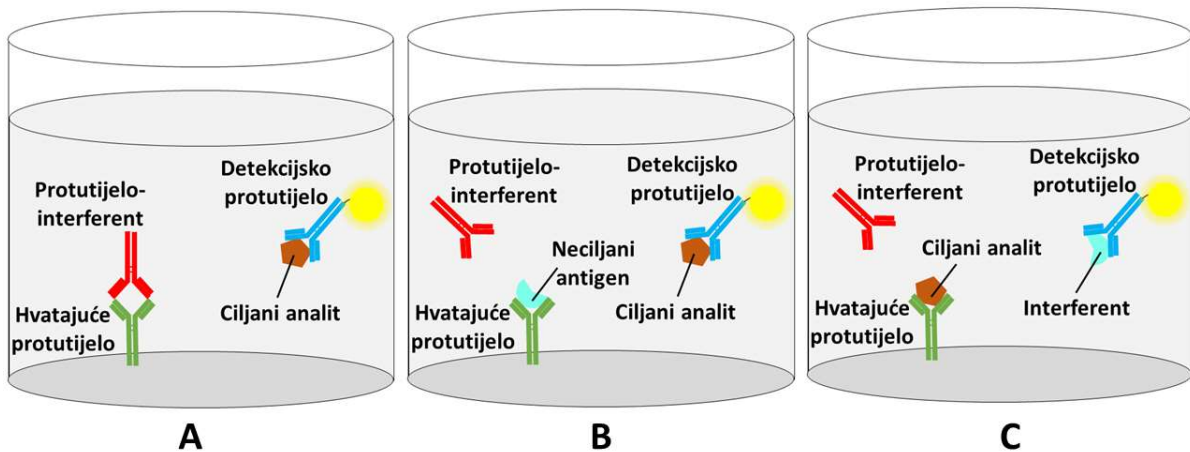
U usporedbi s multiplex formatima, klasična ELISA ne može se koristiti u multiplex formatu iz jednostavnog razloga što se signalna molekula, odnosno produkt enzimske reakcije otpušta u otopinu, za razliku od multiplex imunoeseja, kod kojih signalna molekula ostaje vezana na samo detekcijsko protutijelo.

Iako se multiplex formatima u teoriji može analizirati veliki broj citokina u istom uzorku, najveću prepreku validaciji multiplex formata predstavljaju problemi vezani uz križnu reaktivnost (eng. *cross-reactivity*), nespecifično vezanje i prisustvo protutijela-interferenata (R&D systems, 2017). Kompleksne matrice poput plazme ili seruma mogu biti izvor interferenata. Međutim treba imati na umu i činjenicu da i kemikalije koje se koriste prilikom pripreme uzorka za analizu i samo mjerenje mogu biti izvor interferenata. Bez obzira na izvor interferenata ili mehanizam kojim utječu na signal, interferenti mogu djelomično ili posve prigušiti signal, drugim riječima smanjiti njegov intenzitet ili ga svesti na nemjerljivu razinu. Također mogu povećati signal, a da te promjene u intenzitetu signala nisu direktan odraz promjene koncentracije samog antigena koji se određuje. Kod križne reaktivnosti dolazi do interakcije između hvatajućeg ili detekcijskog protutijela s molekulom različitom od ciljanog antigena, odnosno onog koji se određuje. Takve vrste interakcija često su rezultat sličnosti u strukturi interferenata i analita (slika 8) (Leng i sur., 2008; Tighe i sur., 2015; R&D systems, 2017).



**Slika 8** Prikaz križne reaktivnosti kod imunoeseja (izrađeno prema R&D systems, 2017).

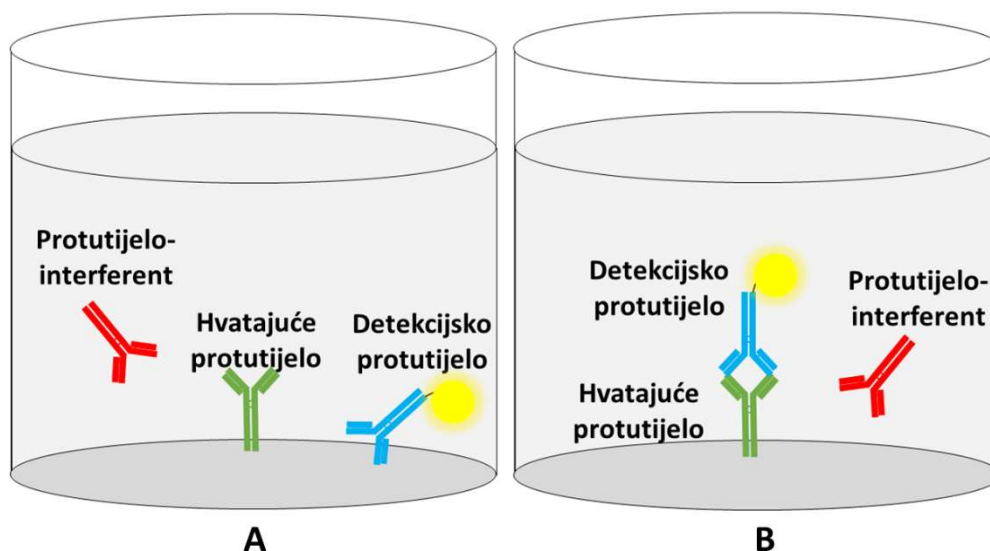
S druge strane protutijela koja su izvorno prisutna u uzorku mogu se križno vezati s hvatajućim ili detekcijskim protutijelom, ali i ciljanim antigenom te tako spriječiti vezanje ciljanog antigena s hvatajućim i detekcijskim protutijelom. Neki od primjera takvih interakcija prikazani su na slici 9 A, B i C (R&D systems, 2017).



**Slika 9** Prikaz utjecaja interferenta na vezanje ciljanog antigena; A) vezanje protutijela-interferenta na hvatajuće protutijelo; B) vezanje neciljanog antigena na hvatajuće protutijelo; C) vezanje interferirajuće molekule na detekcijsko protutijelo (izrađeno prema R&D systems, 2017).

Na slici 9A prikazano je vezanje protutijela-interferenta na hvatajuće protutijelo, pri čemu kompleks detekcijskog protutijela i ciljanog antigena ostaje u slobodnom obliku u otopini. S druge strane može doći do vezanja neciljanog antigena na hvatajuće protutijelo, pri čemu kompleks detekcijskog protutijela i ciljanog antigena te protutijela-interferenta ostaju slobodni u otopini (slika 9B). Na slici 9C vidi se vezani ciljani antigen na hvatajuće protutijelo, a da je pritom spriječeno vezanje detekcijskog protutijela na ciljani antigen, jer je na njega vezana neka druga molekula prisutna u uzorku (R&D systems, 2017).

Nespecifično vezanje hvatajućeg i detekcijskog protutijela (slika 10B) događa se kada dolazi do interakcija navedenih protutijela s površinama izloženima uzorku (slika 10A). Te površine mogu biti površina jažica ili površina mikrozrna (R&D systems, 2017). Jedan od načina kako spriječiti nespecifično vezanje je dodatak tzv. reagensa blokatora ili pufera blokatora (eng. *blocking reagents, blocking buffer*), koji osiguravaju što nižu razinu takvih interakcija (Chiswick i sur., 2012).



**Slika 10** Prikaz nespecifičnog vezanja na površinu jažice; A) interakcija detekcijskog protutijela s površinom jažice; B) nespecifično vezanje hvatajućeg i detekcijskog protutijela (izrađeno prema R&D systems, 2017).

Zbog navedenih razloga, analiza nekompatibilnih skupina citokina i protutijela korištenih u analizi može rezultirati rezultatima mjerenja koja su netočna i odstupaju od prave vrijednosti. Drugim riječima postoji ograničavajući broj i kombinacija citokina koji se zajedno mogu mjeriti unutar istog uzorka (Kupcova i sur., 2017). Također, navedeni razlozi su i glavni

problem koji onemogućava uspješnu validaciju multiplex eseja u kliničke svrhe. Zbog toga se provode opsežna istraživanja kako bi se ovaj problem riješio. Jedno od djelomičnih rješenja koja se koriste i preporučuju kod primjene multiplex eseja jest upotreba minimalne moguće količine protutijela za analizu citokina. Zaključno s time, prije nego što bi se multiplex eseji uopće mogli koristiti u kliničke svrhe, potrebno je prvenstveno riješiti osnovni problem koji je vezan uz križnu reaktivnost (Leng i sur., 2008; R&D systems, 2017).

## **2.5 Usporedba singleplex i multiplex eseja**

Izbor platformi za analizu citokina ovisi o više faktora. U faktore ekonomske prirode ubrajaju se minimalni volumen uzorka potreban za analizu, vrijeme trajanja analize, cijena analize, broj mogućih analita koji se mogu analizirati u istom uzorku istovremeno te zahtjevnost metode (Leng i sur., 2008). S druge strane, faktori koji utječu na samu kvalitetu rezultata, kao što su njihova validacija, standardizacija ili kontrola kvalitete još uvijek predstavljaju izazov za primjenu multiplex eseja u svrhu istraživanja, a još veći izazov za njihovo uvođenje u kliničku praksu (Tighe i sur., 2015).

Najočitija prednost multiplex pred singleplex esejima jest veća količina podataka koja se može generirati iz istog uzorka u istom ili manjem vremenskom okviru, što ujedno predstavlja i potrebu za manjim ukupnim volumenom uzorka (Günther i sur., 2020).

Uzorak u kojem se određuje razina citokina, često je pribavljen u maloj količini te je važno da imunoesej koji se koristi zahtjeva što manji volumen uzorka za ispitivanje. Osim toga, kako bi analiziranje bilo što isplativije, također je potrebno uzeti u obzir i vrijeme analize (Leng i sur., 2008). Za ilustraciju prethodne tvrdnje, može nam poslužiti istraživanje koje su proveli Leng i suradnici (2008). U svojem su radu usporedili količinu potrebnog uzorka za analizu te vrijeme potrebno za samu provedbu analize primjenom ELISA kao singleplex tehnike i dviju multiplex tehnika koje se temelje na komercijalno dostupnim platformama: tzv. MSD esej koji se temelji na hvatajućim protutijelima imobiliziranim na površini jažice te Luminex esej koji se temelji na hvatajućim protutijelima imobiliziranim na površini suspendiranih mikroznana (R&D systems). Za usporedbu su izabrana četiri citokina koja su se analizirala u duplikatu. Pokazano je da za njihovu analizu imunoesejem ELISA bilo potrebno ukupno 1100  $\mu\text{L}$  uzorka seruma ili plazme, odnosno 100-200  $\mu\text{L}$  uzorka po jažici za svaki citokin i 6 sati za cjelokupnu provedbu analize ispitivanja po jednom citokinu. Prema tome ukupno vrijeme za određivanje koncentracije sva četiri citokina iznosi 24 sata. Za razliku od singleplex tehnike, prema istraživanju Leng i sur. (2008), multiplex metode s mogućnošću istovremene analize

četiri citokina u istom uzorku zahtjeva ukupno 25  $\mu$ L uzorka seruma ili plazme po jažici. Konačan volumen za određivanje istih u duplikatu iznosi 50  $\mu$ L te vrijeme za provođenje cjelokupne analize sva četiri citokina iznosi oko 4,5 sati. Prema tome, proizlazi da primjena multiplex metoda dovodi do uštede volumena uzorka od oko 95 % u odnosu na ELISA metodu te se logično ušteta povećava s povećanjem broja analiziranih citokina. Osim toga za analizu četiri citokina bilo je potrebno pet puta manje vremena primjenom multiplex metodama u odnosu na singleplex metodu.

Veliki broj radova objavljenih u zadnjih dvadesetak godina posvećen je usporedbi performansi singleplex i multiplex metoda. Usporedbe su se u najvećem dijelu odnosile na parametre za njihovu validaciju kao što su granica detekcije i kvantifikacije, točnost, preciznost te usporedbu samih rezultata, odnosno koncentracija citokina iz istih uzoraka (F.D.A, 2018). Pokazano je da različite platforme imaju i različitu razinu pouzdanosti i performansi izraženih kroz validacijske parametre. Dodatno, određeni je broj radova bio fokusiran na međulaboratorijsku varijaciju analize te na utjecaj pred-analitičkog dijela procesa analize na same rezultate. Na primjer, jedan od problema je degradacija citokina enzimima iz skupine proteaza. Aktivnost proteaza se zbog toga inhibira dodatkom prikladnog inhibitora (Bio-Rad Laboratories, b). Drugi važni parametri koji su se testirali vezani su uz korake pretpripreme uzorka za analizu, njihovu stabilnost u različitim uvjetima pohrane ili utjecaj ponavljanja ciklusa otapanja i smrzavanja na njihovu stabilnost.

Tako su Christiansson i sur. (2014) proveli određivanje većeg broja citokina u plazmi 36 pacijenata s mijeloičnom leukemijom te su usporedili rezultate dobivene sa singleplex ELISA i dvama multiplex esejima (Luminex i MSD platforme) sljedeći upute proizvođača. Rezultati su pokazali da se platforme međusobno razlikuju po osjetljivosti, odnosno broju uzoraka u kojima je bilo moguće detektirati ciljane citokine što je bilo najočitije u slučaju citokina IFN- $\gamma$ , IL-8 i IL-6. Tako je npr. IFN- $\gamma$  detektiran u svim uzorcima s Luminex platformom, dok samo u 32 % uzoraka s MSD platformom, a tek u nekoliko uzoraka s ELISA. Za razliku od IFN- $\gamma$ , u slučaju IL-8, MSD platforma kojom se mogao mjeriti citokin u svim uzorcima pokazala se osjetljivijom od Luminex platforme u kojoj je IL-8 detektiran u tek 50 % uzoraka. Obje multiplex platforme su se pokazale usporedive s obzirom na broj uzoraka u kojima je detektiran IL-6, u 43 % do 54 % uzoraka. IL-8 i IL-6 nisu detektirani niti u jednom uzorku s ELISA.

Slična istraživanja vezana uz validaciju dviju multiplex platformi, Luminex i MSD proveli su Chowdhury i sur. (2009). Usporedba je provedena za sedam citokina koji su određivani u puliranim uzorcima krvne plazme uzetih od zdravih ljudi. Općenito je detekcijski raspon

koncentracija bio veći kod MSD platforme, iako ta činjenica možda nije od velike važnosti, s obzirom da je uzorke u kojima se mjere citokini moguće razrijediti. Granica kvantifikacije za sve citokine bila je niža kod MSD platforme u usporedbi s Luminex platformom, drugim riječima pokazala se osjetljivijom metodom, a faktor razlike kretao se u rasponu od 1,8 za TNF- $\alpha$  do 20,6 za IFN- $\gamma$ . Pri tome treba napomenuti da se granica kvantifikacije kod imunoloških metoda određuje za svaku mikrotitarsku ploču na temelju uzoraka slijepe probe i to obično dva uzorka. Za usporedbu preciznosti između dva esejja, u uzorke plazme dodana je poznata koncentracija standarda citokina koji su analizirani na različitim mikrotitarskim pločama i u različite dane. Ponovljivost, izražena kao koeficijent varijacije (%) unutar istog dana na jednoj mikroploči po svakom esejju bila je za oba esejja i za sve citokine ispod 20 %, što je unutar kriterija prihvatljivosti od 25 %. S druge strane, ponovljivost među danima na dvije koncentracijske razine bila je različita za različite citokine. Tako je npr. u slučaju IL-4 i IFN- $\gamma$  za obje koncentracijske razine ponovljivost bila unutar kriterija prihvatljivosti od 25 %. Najlošija ponovljivost među danima pokazana za IL-12 koja je bila oko 85 % kod Luminex esejja, dok je kod MSD esejja bila oko 38 %. Za razliku od IL-12, kod IL-10 je bilo obrnuto, ponovljivost na višoj koncentraciji je za Luminex bila oko 4 %, a za MSD esej oko 75 %. Točnost mjerenja kod više koncentracijske razine bila je usporediva za oba esejja, međutim kod niže koncentracijske razine, MSD esej se pokazao kao točniji s time da je razina točnosti ovisila o citokinu. Usporedbom određenih koncentracija IL-8 u uzorcima krvi s oba esejja pokazala je da se apsolutne vrijednosti razlikuju, što znači da se određene koncentracije dobivene dvama esejjima ne mogu uspoređivati, međutim relativne promjene, odnosno odnosi i trendovi su usporedivi između dvaju esejja. Sumarno, svaki od esejja ima prednosti i nedostatke pred drugim esejjem. Dok se MSD esej pokazao osjetljiviji i točniji, Luminex esej je iskazao veću preciznost.

U novijem radu Malekzadeha i suradnika (2017) također su uspoređene dvije platforme po svojim performansama, Luminex i MSD. Za validaciju i njihovu usporedbu mjerena su četiri citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ ) u krvnom serumu i cerebralnoj tekućini pacijenata s multiplom sklerozom. Općenito, oba esejja su pokazala usporedive performanse koje se odnose na točnost, preciznost i granicu detekcije unutar zadanih kriterija istraživanja za obje vrste bioloških uzoraka. Međutim, MSD se pokazao točnijim i preciznijim esejjem od Luminexa, dok je razlika u granici detekcije i kvantifikacije je bila zanemariva.

### 3 Zaključak

ELISA kao pouzdana i validirana tehnika kojom se mogu određivati pojedini citokini, koristi se kao „zlatni standard“ u kliničkoj praksi. Međutim, zbog potrebe za boljim razumijevanjem kompleksnih bolesti, potaknut je razvoj metoda, odnosno eseja koje karakterizira istovremeno određivanje većeg broja različitih citokina unutar istog uzorka, tzv. multiplex metode. Iako se na tržištu nalazi veliki broj komercijalno dostupnih multiplex platformi za takvu analizu, neznatan broj istih se nalazi u kliničkom okruženju s obzirom na to da postoje određeni problemi koji utječu na analizu, zbog čega je validacija multiplex metoda za kliničke svrhe i otežana (Tighe i sur., 2015).

Jedan od najvećih problema koji predstavlja prepreku u validaciji su križne reakcije, odnosno među-interakcije različitih reagensa, uključujući protutijela i same citokine, odnosno druge proteine u uzorku, zbog čega i dolazi do odstupanja mjerenih rezultata od prave vrijednosti. Bez obzira na nedostatke multiplex metoda, postoje brojne prednosti nad singleplex metodama, kao što je ELISA (Leng i sur., 2008; Tighe i sur., 2015).

Za razliku od singleplex formata imunoeseja, multiplex imunoeseji zahtijevaju manje vremena, manje fizičkog rada, cijena analize većeg broja citokina je manja te troše znatno manju količinu biološkog uzorka pri analizi. Osim toga, multiplex u odnosu na singleplex metode imaju povećanu osjetljivost, točnost, preciznost i granici detekcije zbog principa na kojem radi sustav za mjerenje citokina. Ove prednosti multiplex metoda su razlog težnje validaciji istih u kliničke svrhe (Leng i sur., 2008; Kupcova i sur., 2017). Brojna istraživanja su također potvrdila da se apsolutne vrijednosti dobivene različitim esejima ne mogu direktno uspoređivati. Međutim, kada su u pitanju relativne promjene razina citokina, pokazano je da su za određen broj istih, neke platforme usporedive (Chowdhury i sur., 2009).

S obzirom na napredak tehnologije postoje optimistična predviđanja da bi se tijekom vremena multiplex tehnike mogle validirati za kliničku uporabu kako bi se mogla poduzeti pravovremena terapija kod multifaktorskih bolesti koje zahtijevaju analizu većeg broja citokina. Jasno razumijevanje faktora koji utječu na parametre validacije može pomoći istraživanjima pri procjenjivanju različitih multiplex imunoloških tehnika te unaprjeđivanju strategija za optimizaciju i dostizanje kriterija za kliničku uporabu (Tighe i sur., 2015).



## 4 Popis literature

Bio-Rad Laboratories (a) Types of ELISA, <<https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html#4>> Pristupljeno 11. lipnja 2021.

Bio-Rad Laboratories (b) Bio-plex Pro Diabetes Assay, <<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10010747.pdf>> Pristupljeno 7. srpnja 2021.

Brooks A.J., Dekhoda F., Kragelund B.B. (2017) Cytokine Receptors U: Principles of Endocrinology and Hormone Action, Belfiore A., LeRoith D., ur., Endocrinology. Springer. 2-4.

Charles A. Dinarello (2007) Historical insights into cytokines, <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/eji.200737772>> Pristupljeno 15. lipnja 2021.

Charles A. Dinarello, Mihai G. Netea, Takayuki Yoshimoto, Tomohiro Yoshimoto (2014) Cytokine Frontiers Regulation of Immune Responses in Health and Disease, 1. izd, Springer. str. V-X.

Chiswick E. L., Duffy E., Japp B., Remick D. (2012) Detection and quantification of cytokines and other biomarkers. Methods in molecular biology 844: 15-30.

Chowdhury F., Williams A., Johnson P. (2009) Validation and comparison of two multiplex technologies, Luminex and Mesoscale Discovery, for human cytokine profiling. J Immunol Methods 340(1): 55-64.

Christiansson L., Mustjoki S., Simonsson B., Olsson-Strömberg U., Loskog A. S. I., Mangsbo S. M. (2014) The use of multiplex platforms for absolute and relative protein quantification of clinical material. EuPA Open Proteomics 3: 37-47.

Crowther J.R. (2009) The ELISA Guidebook, 2. izd., Springer. str. 9 -11, 13-23, 43-49, 55-57, 69-71, 547.

Dembic Z. (2015) The Cytokines of the Immune System: The Role of Cytokines in Disease Related to Immune Response, 1. izd., Academic Press. str. 1-5.

Dunbar S. A., Hoffmeyer M. R (2013) Microsphere-Based Multiplex Immunoassays: Development and Applications Using Luminex® xMAP® Technology. U: The Immunoassay Handbook, 10. izd., Wild D., ur., Elsevier. str. 157-174.

Ellington A. A., Kullo I. J., Bailey K. R., Klee G. G. (2010) Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges. *Clinical chemistry* 56(2): 186-193.

Elshal, M. F., McCoy, J. P. (2006) Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods* 38(4): 317-323.

Emw (2009) Structure of the CCL17,

<[https://en.wikipedia.org/wiki/CCL17#/media/File:Protein\\_CCL17\\_PDB\\_1nr2.png](https://en.wikipedia.org/wiki/CCL17#/media/File:Protein_CCL17_PDB_1nr2.png)>

Pristupljeno 17. lipnja 2021.

F.D.A, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) (2018) Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation

Günther A., Becker M., Göpfert J., Joos T., Schneiderhan-Marra N. (2020) Comparison of Bead-Based Fluorescence Versus Planar Electrochemiluminescence Multiplex Immunoassays for Measuring Cytokines in Human Plasma. *Frontiers in Immunology* 11.

Herati R. (2006) Solution structure of IL-8,

<[https://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin\\_8#/media/File:IL8\\_Solution\\_Structure.rsh.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin_8#/media/File:IL8_Solution_Structure.rsh.png)>

Pristupljeno 20. lipnja 2021.

Janeway C. A. Jr, Travers P., Walport M. i sur. (2001) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. The interaction of the antibody molecule with specific antigen,

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27160/>> Pristupljeno 26. lipnja 2020.

Kupcova S. H., Cizkova J., Cervenka J., & Vodicka P. (2017) Advances in Proteomic Techniques for Cytokine Analysis: Focus on Melanoma Research. *International journal of molecular sciences* 18(12): 2697.

Leng S. X., McElhaney J. E., Walston J. D., Xie D., Fedarko N. S., Kuchel G. A. (2008) ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 63(8): 879-884.

Malekzadeh A., Twaalfhoven H., Wijnstok N. J., Killestein J., Blankenstein M. A., Teunissen C. E. (2017) Comparison of multiplex platforms for cytokine assessments and their potential use for biomarker profiling in multiple sclerosis. *Cytokine* 91: 145-152.

Meso Scale Discovery (2019) MSD GOLD Streptavidin and Avidin Coated Plates,

<<https://www.mesoscale.com/~media/files/technical%20notes/streptavidin%20avidin%20gold%20plates.pdf>> Pristupljeno 12. lipnja 2021.

- NHGRI (2007) Antibody - National Human Genome Research Institute, <<https://en.wikipedia.org/wiki/Antibody#/media/File:Antibody.svg>> Pristupljeno 18. lipnja 2021.
- Pikec, P. (2020) Citokini i njihov značaj u farmaceutskoj industriji (završni rad).
- R&D systems (2017) Luminex® HP Assays 101 – Overcoming Multiplexing Challenges, <<https://www.rndsystems.com/blog/luminex-hp-assays-101-overcoming-multiplexing-challenges>> Pristupljeno 3. srpnja 2021.
- R&D systems (a) What is a Luminex Assay?, <<https://www.rndsystems.com/what-luminex-assay>> Pristupljeno 30. lipnja 2021.
- R&D systems (b) Luminex Assay Principle, <<https://www.rndsystems.com/resources/technical/luminex-assay-principle>> Pristupljeno 30. lipnja 2021.
- SinoBiological (a) Cytokine Families, <<https://www.sinobiological.com/resource/cytokines/cytokine-families>> Pristupljeno 25. lipnja 2021.
- SinoBiological (b) Cytokine receptor, <<https://www.sinobiological.com/resource/cytokines/cytokine-receptor>> 26. lipnja 2021.
- SinoBiological (c) Cytokine types, <<https://www.sinobiological.com/resource/cytokines/cytokines-types>> 26. lipnja 2021.
- Tighe P. J., Ryder R. R., Todd I., Fairclough L. C. (2015) ELISA in the multiplex era: potentials and pitfalls. *Proteomics Clin Appl* 9(3-4): 406-22.
- Yiğitbaşı T. (2012) Multiplex Immunoassay and Bead Based Multiplex. U: *Trends In Immunolabelled And Related Techniques*, 1. izd., Abuelzein E., ur., Rijeka, InTech. str. 351-360.
- Zhang, J. M., An J. (2007) Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics* 45(2): 27-37.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

A handwritten signature in black ink, reading "Luka Nikić", written in a cursive style. The signature is positioned above a horizontal line.

Luka Nikić