

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Iva HORVAT

**VPLIV BAKTERIJE *Mycoplasma synoviae* NA  
PREŽIVETJE KOKOŠJIH HRUSTANČNIH CELIC V  
POGOJIH *IN VITRO***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Iva HORVAT

**VPLIV BAKTERIJE *Mycoplasma synoviae* NA PREŽIVETJE  
KOKOŠJIH HRUSTANČNIH CELIC V POGOJIH *IN VITRO***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF BACTERIUM *Mycoplasma synoviae* ON SURVIVAL  
OF CHICKEN CHONDROCYTE CELLS IN *IN VITRO* CONDITION**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete.

Študijska komisija dodiplomskega študija oddelka za biotehnologijo je dne 16.06.2010 odobrila naslov diplomskega dela in za mentorico imenovala prof. dr. Mojco Narat.

Recenzent: dr. Dušan Benčina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odelek za agronomijo

Član: prof. dr. Mojca NARAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odelek za zootehniko

Član: znanstveni svetnik dr. Dušan BENČINA  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Iva Horvat se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Iva HORVAT

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Dn                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| DK | UDK 579(043.2)=163.6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| KG | mikrobiologija/mikoplazme/ <i>Mycoplasma synoviae</i> /infekciozni sinovitis/sklepi/hrustanec/kokošje hrustančne celice/celična smrt/apoptoza/kaspaze/kaspaza-3/kaspazna aktivnost                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| AV | HORVAT, Iva                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| SA | NARAT, Mojca (mentorica)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| LI | 2010                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| IN | VPLIV BAKTERIJE <i>Mycoplasma synoviae</i> NA PREŽIVETJE KOKOŠJIH HRUSTANČNIH CELIC V POGOJIH <i>IN VITRO</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| OP | XII, 48 str., 2 pregl., 17 sl., 9 pril., 59 vir.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| AI | Bakterija <i>Mycoplasma synoviae</i> (MS) pri kokoših in puranih, poleg vnetja dihalnih poti, povzroča tudi vnetje sklepov, imenovano infekciozni sinovitis (IS). Posledica tega je propad hrustanca in hrustančnih celic (CCH). V nalogi smo s testom XTT spremljali kako se spreminja viabilnost CCH glede na čas inkubacije z MS. Želeli smo ugotoviti ali je za propad CCH odgovorna apoptoza. S pomočjo »APOPCYTO kita« smo določili aktivnost kaspaze-3, ki je efektorska kaspaza, skupna vsem signalnim potem, ki vodijo v apoptozo. Oba testa, ki smo ju uporabljali, sta spektrofotometrični metodi. Viabilnost CCH smo preverjali ob koncu štirih inkubacijskih časov (24, 48, 72 in 96 ur). Ugotovili smo, da v času 48 ur MS še ne vpliva na preživetje CCH, saj se viabilnost celic očitno zmanjša šele po 72 urah inkubacije in pade na 50 %. Z določitvijo aktivnosti kaspaze-3, smo ugotovili, da imajo celice CCH, ki so primarna kultura, gojena v tretji do šesti pasaži, tudi brez okužbe vedno določeno kaspazno aktivnost in s tem neko predispozicijo, da pride do apoptoze. Kaspazna aktivnost CCH, okuženih z MS, je pri vseh vzorcih zelo nizka in je le malo višja od kaspazne aktivnosti v neokuženih CCH. S tem smo dokazali, da MS pri CCH ne povzroča očitne apoptoze in da je za odmiranje CCH odgovorna druga oblika celične smrti. |

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC UDC 579(043.2)=163.6  
CX microbiology/mycoplasmas/*Mycoplasma synoviae*/infectious synovitis/joints/  
cartilage/chicken chondrocyte cells/cell death/apoptosis/caspases/caspase-3/  
caspase activity  
AU HORVAT, Iva  
AA NARAT, Mojca (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana. Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic study Programme in  
Biotechnology  
PY 2010  
TI THE EFFECT OF BACTERIUM *Mycoplasma synoviae* ON SURVIVAL OF  
CHICKEN CHONDROCYTE CELLS IN *IN VITRO* CONDITIONS  
DT Diplomsko delo (University studies)  
NO XII, 48 p., 2 tab., 17 fig., 9 ann., 59 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Bacteria *Mycoplasma synoviae* (MS) causes the inflammation of respiratory  
tract of chickens and turkeys as well as the inflammation of joints, called  
infectious synovitis (IS). Consequently the cartilage and the chondrocyte cells  
(CCH) are destroyed. During the experiment we observed the change of CCH  
with regard to time incubation with MS. For this we used the test XTT. We also  
researched whether apoptosis is responsible for the destruction of CCH. With  
»APOPCYTO kit« we determined the activity of caspase-3, which is effector  
caspase, common to all signaling pathways, which lead to apoptosis. Both tests,  
which we used, are spectrophotometric methods. Viability of CCH was checked  
at the end of four different incubation times (24, 48, 72 and 96 hours). The  
research shows that in 48 hours MS does not yet influence the survival of CCH.  
Only after 72 hours does the viability of cells visibly decrease, it drops to 50%.  
By determining the caspase-3 activity, it was evident that primary cell culture  
at third to sixth passage always have a certain caspase activity and with it a  
predisposition for apoptosis, even without infection. Caspase activity of MS  
infected CCH is in all samples very low and only little higher than negative  
control. With this it was proven, that MS does not cause evident apoptosis of  
CCH and that another form of cell death is responsible for dying off of CCH.

## KAZALO VSEBINE

|                                                   | str.      |
|---------------------------------------------------|-----------|
| Ključna dokumentacijska informacija (KDI)         | III       |
| Key words documentation (KWD)                     | IV        |
| Kazalo vsebine                                    | V         |
| Kazalo preglednic                                 | VIII      |
| Kazalo slik                                       | IX        |
| Kazalo prilog                                     | X         |
| Okrajšave in simboli                              | XI        |
| <b>1 UVOD</b>                                     | <b>1</b>  |
| 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA                          | 1         |
| 1.2 NAMEN NALOGE                                  | 1         |
| 1.3 DELOVNA HIPOTEZA                              | 2         |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>                            | <b>3</b>  |
| 2.1 CELIČNA SMRT                                  | 3         |
| <b>2.1.1 Apoptoza – programirana celična smrt</b> | <b>4</b>  |
| 2.1.1.1 Kaspaze                                   | 5         |
| 2.1.1.2 Kaspaze in razpad kromatina               | 9         |
| <b>2.1.2 Nekroza</b>                              | <b>9</b>  |
| <b>2.1.3 Avtofagija</b>                           | <b>10</b> |
| 2.1.3.1 Avtofagija s šaperoni                     | 11        |
| 2.1.3.2 Makroavtofagija                           | 11        |
| 2.1.3.3 Mikroavtofagija                           | 11        |
| 2.2 ZGRADBA IN FUNKCIJA HRUSTANČNEGA TKIVA        | 12        |
| <b>2.2.1 Hialini hrustanec</b>                    | <b>12</b> |
| <b>2.2.2 Sklep</b>                                | <b>13</b> |
| <b>2.2.3 Spremembe v okuženih sklepih</b>         | <b>14</b> |
| 2.3 MIKOPLAZME                                    | 15        |
| <b>2.3.1 Značilnosti infekcijskega sinovitis</b>  | <b>18</b> |
| <b>3 MATERIAL IN METODE</b>                       | <b>19</b> |
| 3.1 PRIPRAVA KULTURE <i>M. synoviae</i> WVU 1853  | 19        |
| 3.2 GOJENJE CELIČNIH KULTUR                       | 19        |

|              |                                                                                          |    |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>3.2.1</b> | <b>Gojenje primarne kulture hondrocitov</b>                                              | 19 |
| 3.2.1.1      | Odmrzovanje                                                                              | 19 |
| 3.2.1.2      | Štetje celic                                                                             | 20 |
| 3.2.1.3      | Zamrzovanje in shranjevanje celic                                                        | 20 |
| <b>3.2.2</b> | <b>Gojenje suspenzijskih celic Jurkat</b>                                                | 21 |
| 3.3          | OPTIMIZACIJA EKSPERIMENTALNIH POGOJEV                                                    | 21 |
| <b>3.3.1</b> | <b>Določanje podvojitvenega časa in optimizacija števila celic</b>                       | 21 |
| 3.3.1.1      | Določanje podvojitvenega časa celic                                                      | 21 |
| 3.3.1.2      | Optimizacija števila celic                                                               | 22 |
| <b>3.3.2</b> | <b>Primerljivost rezultatov štetja celic s pomočjo tripanskega modrila in testom XTT</b> | 22 |
| 3.4          | NAČRT POSKUSA                                                                            | 22 |
| <b>3.4.1</b> | <b>Nasaditev hrustančnih in celic Jurkat v 6 in 96- lukenjske plošče</b>                 | 22 |
| <b>3.4.2</b> | <b>Okužba celičnih kultur</b>                                                            | 25 |
| 3.4.2.1      | Okužba celic z <i>M. synoviae</i> WVU 1853                                               | 25 |
| 3.4.2.2      | Inkubacija celic s 5-fluorouracilom (5-FU)                                               | 25 |
| <b>3.4.3</b> | <b>Test XTT</b>                                                                          | 25 |
| <b>3.4.4</b> | <b>Test določanja aktivnosti kaspaze-3</b>                                               | 26 |
| 3.4.4.1      | Princip delovanja testa                                                                  | 26 |
| 3.4.4.2      | Izvedba testa                                                                            | 27 |
| <b>3.4.5</b> | <b>Določanje koncentracije proteinov po metodi po Bradfordu</b>                          | 28 |
| 3.4.5.1      | Princip delovanja                                                                        | 28 |
| 3.4.5.2      | Izvedba testa                                                                            | 28 |
| <b>3.4.6</b> | <b>Statistična analiza podatkov</b>                                                      | 29 |
| <b>4</b>     | <b>REZULTATI</b>                                                                         | 30 |
| 4.1          | REZULTATI OPTIMIZACIJSKIH POSKUSOV                                                       | 30 |
| <b>4.1.1</b> | <b>Optimizacija števila celic za test XTT</b>                                            | 30 |
| <b>4.1.2</b> | <b>Primerjava med testom XTT in štetjem s tripanskim modrilom</b>                        | 30 |
| <b>4.1.3</b> | <b>Podvojitveni čas</b>                                                                  | 31 |
| 4.2          | VPLIV <i>M. synoviae</i> NA PREŽIVETJE CELIC                                             | 33 |
| 4.3          | VPLIV <i>M. synoviae</i> NA AKTIVNOST KASPAZE-3                                          | 34 |
| <b>5</b>     | <b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>                                                                | 37 |
| 5.1          | RAZPRAVA                                                                                 | 37 |

|              |                                                        |           |
|--------------|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5.1.1</b> | <b>Optimizacijski poskusi</b>                          | <b>37</b> |
| <b>5.1.2</b> | <b>Vpliv <i>M. synoviae</i> na preživetje celic</b>    | <b>39</b> |
| <b>5.1.3</b> | <b>Vpliv <i>M. synoviae</i> na aktivnost kaspaze-3</b> | <b>40</b> |
| <b>5.2</b>   | <b>SKLEPI</b>                                          | <b>42</b> |
| <b>6</b>     | <b>POVZETEK</b>                                        | <b>43</b> |
| <b>7</b>     | <b>VIRI</b>                                            | <b>44</b> |
|              | <b>ZAHVALA</b>                                         |           |
|              | <b>PRILOGE</b>                                         |           |



## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                | str. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Preglednica 1: Rezultati optimizacijskega poskusa s katerim smo preverjali podvojevalni čas celic Jurkat.      | 32   |
| Preglednica 2: Število celic, ki smo jih nasadili v 6- in 96-lukenjske plošče glede na število dni inkubacije. | 32   |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                       | str. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Slika 1: Tri glavne poti celične smrti.                                                                               | 3    |
| Slika 2: Nastanek prstov.                                                                                             | 4    |
| Slika 3: Aktivacija iniciacijskih kaspaz in efektorskih kaspaz.                                                       | 6    |
| Slika 4: Receptor celične smrti – vezava prokaspaze-8 na DISC.                                                        | 7    |
| Slika 5: Mitohondrijsko odvisna apoptotska pot.                                                                       | 8    |
| Slika 6: Sestava sklepa.                                                                                              | 13   |
| Slika 7: Sestava hrustanca.                                                                                           | 13   |
| Slika 8: Leva noga po inukolaciji v stopalo z <i>M. synoviae</i> in zdrava desna noga.                                | 18   |
| Slika 9: Fotografije celic, ki smo jih gojili v gojitvenih posodicah.                                                 | 23   |
| Slika 10: Postopek za nasaditev hrustančnih celic in celic Jurkat v 6- in 96-lukenjske plošče.                        | 24   |
| Slika 11: Substrat, ki smo ga uporabljali pri določanju kaspazne aktivnosti.                                          | 26   |
| Slika 12: Umeritveno območje testa XTT – celice Jurkat.                                                               | 30   |
| Slika 13: Spreminjanje števila celic Jurkat glede na čas inkubacije.                                                  | 31   |
| Slika 14: Viabilnost hrustančnih celic (CCH) in celic Jurkat ob koncu različno dolgih inkubacijskih časov (test XTT). | 33   |
| Slika 15: Vpliv okužbe z bakterijo <i>Mycoplasma synoviae</i> na preživetje celic Jurkat in hrustančnih celic.        | 34   |
| Slika 16: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije pNA.                                                         | 35   |
| Slika 17: Aktivnosti kaspaze-3 v celicah Jurkat in hrustančnih celicah glede na čas inkubacije.                       | 36   |

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Optimizacijski poskusi

Priloga A1: Primerjava med standardnim načinom štetja s pomočjo barvila tripanskega modrila in testom XTT. Celice Jurkat.

Priloga A2: Podatki za umeritveno območje na sliki 12

Priloga B: Rezultati testa XTT. Merjenje absorbance pri času inkubacije a) 24h; b) 48h; c) 72h d) 96h

Priloga C: Test določanja stopnje aktivnosti kaspaze-3

Priloga C1: Podatki za umeritveno krivuljo na sliki 14

Priloga C2: Rezultati testa določanja stopnje aktivnosti kaspaze-3 za celice Jurkat

Priloga C3: Rezultati testa določanja stopnje aktivnosti kaspaze-3 za hrustančne celice

Priloga D: Določanje koncentracije proteinov

Priloga D1: Rezultati določanja koncentracije proteinov za celice Jurkat

Priloga D2: Rezultati določanja koncentracije proteinov za hrustančne celice

Priloga D3: Povprečne absorbance pri celicah Jurkat in hrustančnih celicah glede na čas inkubacije pri testu določanja koncentracije proteinov

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|        |                                                                                                                          |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AIF    | dejavnik, ki inducira apoptozo (apoptosis-inducing factor)                                                               |
| Apaf-1 | faktor1, ki aktivira apoptotske proteaze (apoptotic protease activating factor1)                                         |
| Bak    | antagonist/ubijalec homologen Bcl-2 (Bcl-2 homologous antagonist/killer)                                                 |
| Bax    | z Bcl-2 povezan X protein (Bcl-2-associated X protein)                                                                   |
| Bcl-2  | limfom 2 B-celic (B-cell lymphoma 2)                                                                                     |
| CAD    | deoksiribonukleaza, ki aktivira kaspaze (caspase-activated deoxyribonuclease)                                            |
| CAPS   | kaspaze (cysteine-dependent aspartate-specific proteases)                                                                |
| CCH    | kokošje hrustančne celice (chicken chondrocyte cells)                                                                    |
| CEC    | celična linija piščančjih fibroblastov (chicken embryo cells)                                                            |
| CER    | kokošji eritriciti (chicken embryonic cell line)                                                                         |
| CFU    | število enot, ki tvorijo kolonije (colony forming units)                                                                 |
| CMA    | avtofagija s šaperoni (Chaperone-mediated autophagy)                                                                     |
| DEVD   | zaporedje aspartat-glutamat-valin-aspartat (aspartate (D)- glutamate (E)- valine (V)- aspartate (D))                     |
| DISC   | signalni kompleks, ki inducira smrt (death inducing signalling complex)                                                  |
| D-MEM  | modificirano gojišče (Dulbecco's Modified Eagle Medium)                                                                  |
| DNA    | deoksiribonukleinska kislina (Deoxyribonucleic acid)                                                                     |
| DTT    | dititritol (dithiothreitol)                                                                                              |
| EDTA   | kelator (2,2',2'',2'''-(etan-1,2-diildinitrilo)tetraacetna kislina)                                                      |
| FADD   | protein povezan z domeno smrti Fas receptorja (Fas-Associated protein with Death Domain)                                 |
| FBS    | fetalni goveji serum (fetal bovine serum)                                                                                |
| FMK    | fluorometil keton (Fluoromethyl ketone)                                                                                  |
| HBSS   | pufer (Hank's balanced salt solution)                                                                                    |
| ICAD   | inhibitor deoksiribonukleaze, ki aktivira kaspaze (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease)                     |
| Kbp    | kilo-bazni pari, enota za dolžino nukleinskih kislin (1000bp)                                                            |
| kDa    | kilodalton, enota za molekulsko maso                                                                                     |
| NAD    | nikotinamid adenin dinukleotid (Nicotinamide adenine dinucleotide)                                                       |
| NCCD   | nomenklatura odbor za celično smrt (The Nomenclature Committee on Cell Death)                                            |
| PARP   | Poli-ADP ribozna polimeraza (Poly ADP ribose polymerase)                                                                 |
| pNA    | p-nitroanilid (p-nitroanilide)                                                                                           |
| PT     | prepustno prehajanje (permeability transition)                                                                           |
| RIP    | serinsko/treoninska-proteinska kinaza, ki se poveže z receptorjem (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase) |
| ROS    | reaktivni kisikovi radikali (reactive oxygen species)                                                                    |

|       |                                                                                                                                                                 |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| rpm   | obrati na minuto ( <u>r</u> evolutions per <u>m</u> inute)                                                                                                      |
| RPMI  | gojišče za celične kulture ( <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute medium)                                                            |
| TRAIL | TNF-soroden ligand, ki inducira apoptozo ( <u>T</u> umor necrosis factor (TNF)- <u>r</u> elated <u>a</u> poptosis- <u>i</u> nducing <u>l</u> igand)             |
| TNF   | dejavnik tumorske nekroze ( <u>T</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor)                                                                                      |
| TRADD | protein povezan z domeno smrti TNF receptorja ( <u>T</u> umor necrosis factor <u>r</u> eceptor type 1- <u>a</u> ssociated <u>D</u> eath <u>d</u> omain protein) |
| XTT   | tetrazolijeva sol (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid)                                                                    |
| 5-FU  | 5-fluorouracil (5-fluoro-1 <i>H</i> -pirimidin-2,4-dione)                                                                                                       |

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Bakterija *Mycoplasma synoviae* pri kokoših in puranih najpogosteje povzroča okužbo zgornje dihalne poti, vendar navadno ni izraženih kliničnih znakov. V napredovanju bolezni včasih pride tudi do okužbe spodnjega dihalnega trakta, vnetja zračnih vreč in pri nekaterih pogojih tudi do infekciозnega sinovitisa, ki ima dve fazi: akutno in kronično. Značilnosti akutne faze so otekli sklepi, vnetje sinovialne membrane in tetive, povečana količina sinovialne tekočine, anemija. Te spremembe se pojavijo po 1-3 tednih po okužbi. Po akutni fazi nastopi kronična faza. Za njo je značilna tanjša plast hrustanca, kjer pa nastanejo tudi erozije. Očitne spremembe so vidne 7-8 tednov po okužbi.

*M. synoviae* v telo vstopa preko dihal, od koder se s krvnim obtokom lahko prenese v druge dele telesa, lahko pa vdre tudi v gostiteljeve celice. Pomemben korak pri uspešni kolonizaciji in patogenezi mikoplazem je njihova sposobnost, da se pritrdijo na površino epitelnih celic. Adherentnost je glavni virulentni faktor mikoplazem, saj so sevi, ki se niso sposobni pritrditi, manj virulentni. Kljub domnevam, da mikoplazme ostanejo pritrjene na površini epitelnih celic, nedavne študije kažejo, da imajo nekatere vrste mikoplazem razvit mehanizem za vstop v gostiteljeve nefagocitirajoče celice in lahko znotraj njih preživijo. To jim omogoča raznašanje po telesu, izmikanje imunskemu sistemu, hkrati pa verjetno povzroča tudi propad celic, v katerih se razmnožujejo. *M. synoviae* so našli tudi v vnetih sklepih in dokazali, da v pogojih *in vitro* lahko invadira v hrustančne celice (Dušanić in sod., 2009).

V okuženem hrustančnem tkivu se zgodijo fenotipske spremembe, ki so posledica okvare in sprememb v izražanju genov. Okužba povzroči izražanje celičnih faktorjev, ki stimulirajo celično smrt in sintetizirajo drugačno sestavo izvenceličnega matriksa. Študije kažejo, da okužba celic z *M. synoviae* že po 24 urah povzroči 30 % zmanjšanje števila živih celic CEC-32 (celična linija piščančjih fibroblastov). Ne ve se, kako pride do smrti celic: ali po nekrozi ali se aktivira programirana celična smrt – apoptoza.

### 1.2 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil ugotoviti kakšen je čas inkubacije *M. synoviae* s hrustančnimi celicami, v katerem povzroči propad kokošjih hrustančnih celic in ugotoviti, ali se pri tem sproži programirana celična smrt – apoptoza ali morda katera druga oblika celične smrti.

S testom XTT smo želeli spremljati in pokazati kako se spreminja viabilnost celic glede na čas inkubacije *M. synoviae* s hrustančnimi celicami. Vprašanje je bilo ali se pri tem aktivira apoptoza, kar smo preverili s pomočjo »APOPCYTO kita«, s katerim smo lahko spremljali količino kaspaze-3 v okuženih celicah.

### 1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Pričakovali smo, da se bo viabilnost celic s časom inkubacije celic z *M. synoviae* zmanjšala. Prav tako smo pričakovali, da je to zmanjšanje števila živih celic posledica programirane celične smrti in da se bo izražanje kaspaze-3, ki je značilna za apoptozo, povečalo, če bo okužba z *M. synoviae* daljša.

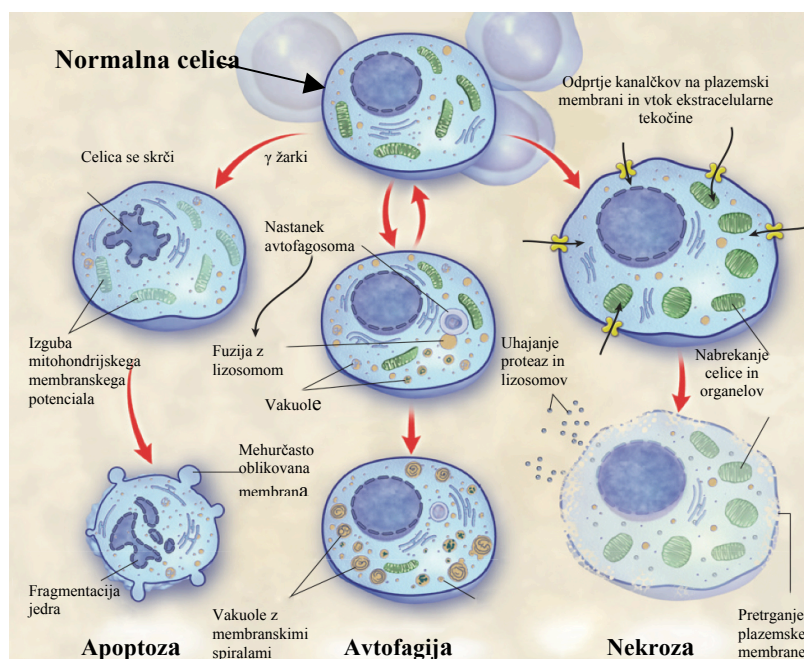
## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 CELIČNA SMRT

Vsaka celica ima svoj celični cikel, ki je zelo natančno reguliran: celica se deli, raste, opravlja svojo funkcijo in na koncu umre. Za ohranitev primerne homeostaze so vse faze enako pomembne.

Dejstvo, da je edina gotovost v življenju smrt, je pripeljalo do velikega napredka v znanju o celični smrti, vendar pa veliko vprašanj še vedno ostaja neodgovorjenih. Ve se, da obstaja več tipov celične smrti, ne pa, zakaj so nekatere celice, kot so nevroni, bolj dovzetne za ishemično celično smrt kot druge? Kako celica izbere posamezni tip smrti? Kakšni so pogoji, ki vodijo k izbiri poti posamezne celične smrti? Kdaj je celica nepreklicno podvržena smrti? Odgovori na takšna in podobna vprašanja vodijo k temeljitejšemu razumevanju celične smrti, ki so osnova za razvoj terapevtskih učinkovin (Burgering in Kops, 2002; Hotchkiss in sod., 2009).

NCCD (The Nomenclature Committee on Cell Death) je poenotil kriterije za določitev celične smrti in njihove različne morfologije. Glede na to klasifikacijo lahko prepoznamo 12 tipov celične smrti – 4 tipične in 8 netipičnih. Najbolj značilni tipi celične smrti so apoptoza, avtofagija, kornifikacija in nekroza. Dokazano je, da je le za apoptozo in avtofagijo potrebno izražanje določenih genov. Za netipične celične smrti molekularni mehanizem ni dobro raziskan, vendar pa se te oblike celične smrti ločijo po morfoloških znakih (Zhivotovsky in Orrenius, 2010; Kroemer in sod., 2005).



Slika 1: Tri glavne poti celične smrti (prirejeno po Hotchkiss in sod., 2009: 1572)



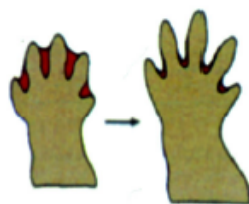
Izboljšane metode za določitev tipa celične smrti kažejo, da so posamezne biokemijske in morfološke lastnosti določenega tipa celične smrti lahko prisotne v isti celici (Festjens in sod., 2006). Kot primer, inaktivacija kaspaze lahko povzroči spremembo iz apoptoze v nekrozo. Odvisno od tipa signala, ki sproži proces celične smrti, se lahko proces začne na različnih znotrajceličnih predelih in navzkrižna komunikacija med temi predeli je pomembna za vse tipe celične smrti (Zhivotovsky in Orrenius, 2010).

### 2.1.1 Apoptoza – programirana celična smrt

Apoptoza ali programirana celična smrt je običajen proces celic večceličnih organizmov. Celice umrejo, ker na njih delujejo različni dejavniki. Proces apoptoze poteka kontrolirano in v določenih zaporednih korakih. Pri tem procesu imajo celice aktivno vlogo pri svoji lastni smrti, zato apoptozi rečemo tudi celični samomor (Dash, 2005; Gewies, 2003).

Izraz *programirana celična smrt* je bil vpeljan leta 1964, saj celična smrt, kot faza v razvoju, ni naključje, ampak je zaporedje kontroliranih korakov, ki vodijo v lokalno in časovno določeno samouničenje. Leta 1972 so vpeljali izraz *apoptoza*, ker opisuje morfološki proces, ki vodi v kontrolirano samouničenje celice. Beseda *apoptoza* je grškega izvora in pomeni »odpadanje«, podobno kot odpadanje listov iz dreves ali cvetja iz rož (Gewies, 2003).

Za razvoj in vzdrževanje večceličnih organizmov je zelo pomembno razmerje med na novo nastalimi celicami in celicami, ki umrejo. Skozi razvoj organizma veliko celic nastane v prebitku in kmalu podležejo programirani celični smrti, vendar s tem omogočijo oblikovanje organov in tkiv. Dober primer programirane celične smrti v embrionalnem razvoju živali je nastanek prstov z masovno celično smrtjo (slika 2), v odraslem organizmu pa je apoptoza pomembno prisotna pri razvijajočih se limfocitih, kjer celice umirajo med gensko selekcijo limfocitov (Gewies, 2003).



Slika 2: Nastanek prstov (Gewies, 2003: 3)

Procesi apoptoze so torej širšega biološkega pomena, saj sodelujejo pri razvoju, diferenciaciji, proliferaciji/homeostazi, pri imunskem sistemu ter pri odstranjevanju okvar, torej škodljivih celic. Tako tudi napake pri delovanju ali regulaciji apoptoze vodijo v patološke znake. Odsotnost apoptoze lahko povzroči raka, avtoimunske bolezni ali

razširjenost virusnih okužb, medtem ko so nevrodegenerativne motnje, AIDS in ishemične bolezni posledica prekomerne apoptoze (Gewies, 2003).

Apoptotične celice lahko prepoznamo po stereotipnih morfoloških spremembah: celica se krči, nastajajo deformacije in izgublja stik s sosednjimi celicami. Kromatin se skrči in zgosti ob jedrno membrano, plazmatska membrana se mehurčasto oblikuje in na koncu se celica fragmentira v kompaktne membransko zaprte strukture, imenovane »apoptotska telesca«, ki vsebujejo citosol, kondenziran kromatin in organele. Makrofagi nato fagocitirajo ta apoptotska telesca in jih tako odstranijo iz tkiva, brez da bi nastal kakršenkoli vnetni odgovor (Gewies, 2003; Dash, 2005).

Morfološke spremembe so posledica značilnih molekularnih in biokemijskih dogodkov v apoptotičnih celicah; aktivacije proteolitičnih encimov, ki posredno cepijo DNA v nukleosomalne fragmente kot tudi množico specifičnih proteinskih substratov, ki določajo stabilnost in obliko citoplazme ali organelov (Gewies, 2003).

Apoptoza je zelo regulirani in učinkoviti celični program, ki zahteva sodelovanje velikega števila dejavnikov. Komponente apoptotske signalne mreže so gensko kodirane in tako v celičnem jedru čakajo na aktivacijo z dejavniki, ki inducirajo smrt in lahko prihajajo iz zunanosti celice ali iz njene notranosti. Dejavniki, ki sprožijo apoptozo, so npr. vezava receptorjev na površini celic, poškodbe DNA kot posledica okvare podvojevalnega mehanizma DNA, zdravljenje s citotoksičnimi snovmi ali sevanjem, pomanjkanje signalov za preživetje celic in mnogi drugi. Vsi ti pa aktivirajo skupni mehanizem celične smrti, ki vodi k značilnostim apoptoze (Gewies, 2003).

#### 2.1.1.1 Kaspaze

Kaspaze so družina proteinov, ki so eden izmed glavnih izvrševalcev apoptotskega procesa. Pripadajo skupini encimov, imenovanih cisteinske proteaze. Izraz kaspaze je izpeljan iz cysteine-dependent aspartate-specific proteases (cisteinsko-odvisne aspartatsko-specifične proteaze), ker imajo v aktivnem mestu aminokislino cistein ter delujejo tako, da cepijo peptidno verigo za aminokislino aspartatom (Gewies, 2003; Dash, 2005).

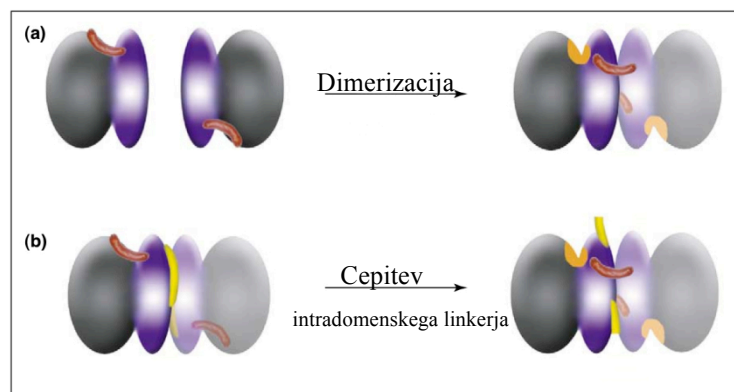
Značilno zanje je, da imajo strogo hierarhijo delovanja. Tako jih delimo na:

- iniciacijske ali apikalne (CASP-2, CASP-8, CASP-9, CASP-10) - sposobne so samoaktivacije in aktivacije efektorskih kaspaz,
- efektorske ali izvrševalne (CASP-3, CASP-6, CASP-7) - razgrajujejo substrate in izvršijo apoptozo

Neregulirana kaspazna aktivnost bi bila za celice letalna, zato se v celici nahajajo kaspaze kot neaktivni cimogeni ali prokaspaze (Boatright and Salvesen, 2003).

Aktivne iniciacijske kaspaze so dimeri z dvema enakima katalitskima enotama, vsaka ima po eno aktivno mesto. Vsaka katalitska enota je sestavljena iz manjše in večje podenote. V celici so cimogeni teh kaspaz kot monomeri, ki se aktivirajo z dimerizacijo (Boatright in Salvesen, 2003).

V nasprotju z iniciacijskimi kaspazami so neaktivne efektorske prokaspaze dimeri, ki so med seboj povezane med domenama (s t.im. interdomenskim linkerjem). Aktivirajo jih iniciacijske kaspaze ali druge proteaze, tako, da cepijo interdomenski linker in s tem spremenijo konformacijo kaspaze in omogočijo translokacijo aktivacijske zanke, ki pospeši odkritje aktivnega mesta (Boatright and Salvesen, 2003).

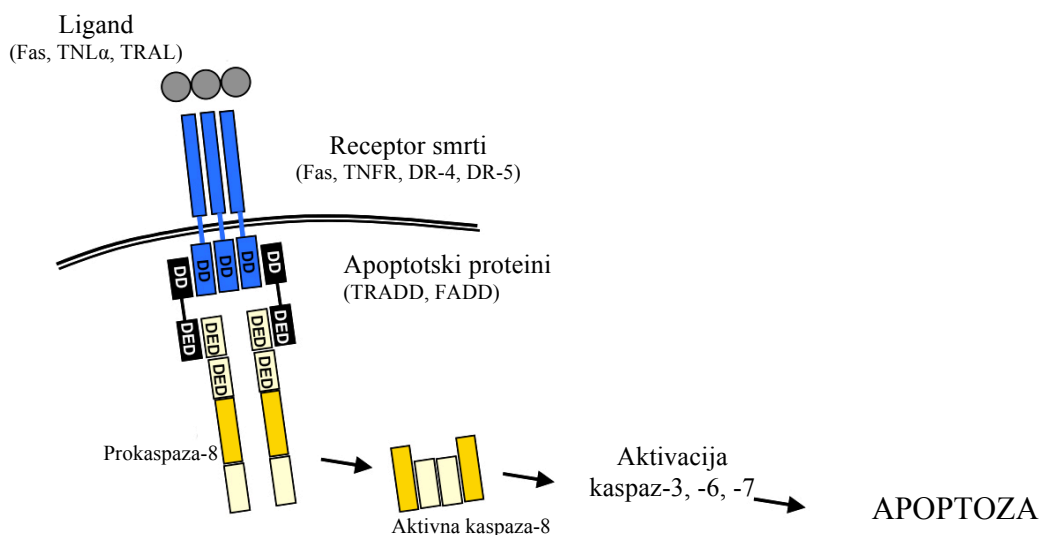


Slika 3: Aktivacija a) iniciacijskih kaspaz in b) efektorskih kaspaz (prirejeno po Boatright in Salvesen, 2003: 727)

Kaspaze se nahajajo v notranjosti celice, v citoplazmi, in so posredniki med apoptotskimi signali in končnimi izvrševalci, ki cepijo substrate in s tem povzročijo morfološke spremembe.

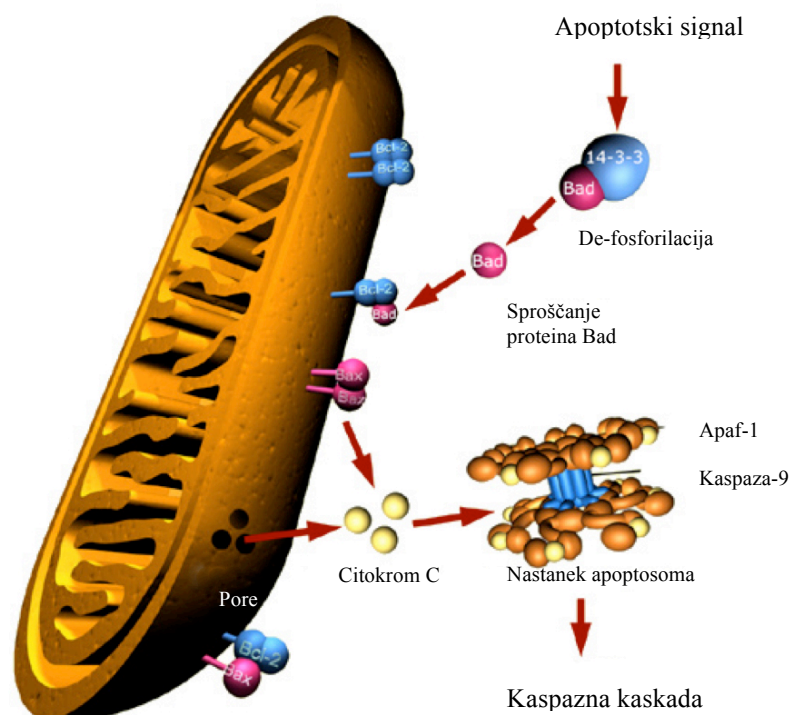
Ekstrinzična pot signalizacije (kadar pride stimul iz zunanosti celice) je odgovorna za odstranitev neželenih celic med razvojem, med zorenjem imunskega sistema ter samim imunskim nadzorom. Začne se z vezavo transmembranskega receptorja celične smrti (Boatright and Salvesen, 2003) z ustreznim ligandom. Ligand Fas se veže na receptor CD95, ligand TNF  $\alpha$  se veže z receptorjem TNF, ligand TRAIL pa je specifičen za receptorja DR-4 in DR-5. Vezava liganda z receptorjem povzroči prenos apoptotskega signala. Receptorji celične smrti aktivirajo kaspazno kaskado zelo hitro po vezavi liganda (Dash, 2005; Gewies, 2003).

Čeprav so razlike med signalnimi potmi, aktiviranimi z različnimi receptorji celične smrti, imajo te poti nekatere skupne lastnosti. Vezava liganda na njegov receptor lahko vodi do pomnožitve ceramida (lipid v membrani), kar povzroči nakopičevanje lipidnih raftov in s tem receptorjev celične smrti na določen predel na celici, kar ojača apoptotski signal. Vezava liganda povzroči konformacijske spremembe na intracelularni domeni receptorja kar odkrije domeno smrti ("death domain"), kamor se vežejo različni apoptotski proteini. Proteinski kompleks receptorja z apoptotskimi proteini (TRADD, FADD) se imenuje DISC (death inducing signalling complex). Zadnji korak tega procesa je vezava ene od kaspaz na DISC (najpogostejše kaspaze-8). To vodi v aktivacijo kaspaze in začetek apoptoze. Od tu naprej, vodita dve poti (Gewies, 2003).



Slika 4: Receptor celične smrti – vezava prokaspaze-8 na DISC (prirejeno po Gewies, 2003: 8)

V nekaterih celicah lahko aktivna kaspaza-8 direktno aktivira efektorske kaspaze, ki cepijo specifične substrate, kar vodi v celično smrt. To so celice tipa I. V celicah tipa II, pa signal iz aktiviranih receptorjev ni dovolj močan, da bi se aktivirala kaspazna signalna kaskada za izvršitev celične smrti, zato je potrebno, da se signal ojača preko mitohondrijsko-odvisne apoptotske poti. Vezni člen med kaspazno signalno kaskado in mitohondrijem je protein Bid iz družine proteinov Bcl-2. Kaspaza-8 cepi Bid in njegova skrajšana oblika (tBid) se prenese do mitohondrija, kjer skupaj s proapoptotskima članoma družine Bcl-2, Bax in Bak inducira sproščanje citokroma c in drugih mitohondrijskih faktorjev (apoptosis-inducing factor-AIF, endonukleaza endoG, Smac/Diablo in Htr/Omi) v citosol. Citosolni citokrom c se veže na monomerne Apaf-1, ki oligomerizirajo v apoptosom, kompleks v obliki kolesa, kar sproži aktivacijo iniciacijske prokaspaze-9. Aktivirana kaspaza-9 pa začne kaspazno kaskado z aktivacijo efektorskih kaspaz kot so kaspaza-3, kaspaza-7 in kaspaza-6 (Gewies, 2003).



Slika 5: Mitohondrijsko odvisna apoptotska pot (prirejeno po Dash, 2005: 3)

Poleg ojačanja in sodelovanja pri ekstrinzični apoptotski poti, ima mitohondrij osrednjo vlogo pri prenašanju signalov smrti, ki izvirajo iz notranjosti celice kot so poškodbe DNA, oksidativni stres, stradanje, kot tudi tistih, ki nastanejo zaradi kemoterapevtskih zdravil (Gewies, 2003).

Po indukciji s signalom smrti, mitohondrij postane selektivno prepusten, kar vodi v sproščanje citokroma c in vezavo in aktivacijo apikalnih kaspaz intrinzične signalne poti, kaspaze-9 (Boatright in Salvesen, 2003).

Proteini Bcl-2 so družina proteinov, ki so vpleteni v odgovor na apoptozo. Nekateri teh proteinov so anti-apoptotski, medtem ko so drugi proapoptotski. Občutljivost celice na apoptozo je lahko odvisna od količine pro- in anti- apoptotskih bcl-2 proteinov. Ko je prebitek pro-apoptotskih proteinov, je celica bolj občutljiva na apoptozo, medtem ko je bolj odporna, če je prebitek anti-apoptotskih proteinov. Količina pro-apoptotskih proteinov na površini mitohondrijev je pomembna pri nastanku por, ki omogočajo prepustnost membrane, t.im. por PT (permeability transition pore) (Dash, 2005).

Pro-apoptotski proteini so v citosolu, kjer delujejo kot senzorji za celične poškodbe ali stres. Ob zaznavi teh signalov se prestavijo na površino mitohondrija, kjer so nameščeni anti-apoptotski proteini. Ta interakcija med pro- in anti-apoptotskimi proteini onemogoči normalno delovanje anti-apoptotskih proteinov, kar vodi v nastanek por na mitohondriju in

sproščanje citokroma c in drugih pro-apoptotskih molekul iz intermembranskega prostora (Gewies, 2003).

#### 2.1.1.2 Kaspaze in razpad kromatina

Ena izmed značilnosti apoptoze je cepitev kromosomalne DNA v nukleosomalne enote. Kaspaze imajo pomembno vlogo pri tem procesu, saj aktivirajo DNaze, inhibirajo encime za podvojevanje DNA in porušijo strukturo proteinov v jedru.

##### 1. *Inaktivacija encimov, ki sodelujejo pri podvojevanju DNA*

Encim PARP je pomemben DNA podvojevalni encim in je eden izmed prvih proteinov, ki je bil identificiran kot substrat kaspaz. Cepi ga kaspaza-3 in s tem onemogoči njegovo sposobnost podvojitve DNA.

##### 2. *Uničenje strukturnih proteinov jedra*

Lamini so intranuklearni proteini, ki dajejo obliko jedru in so posredniki med kromatinom in jedrno membrano. Kaspaza-6 razgradi lamine, kar povzroči kondenzacijo kromatina in fragmentacijo jedra.

##### 3. *Fragmentacija DNA*

Fragmentacijo DNA v nukleosomalne enote povzroči encim CAD (caspase activated DNase). V celici je kot neaktivni kompleks z inhibitorjem encima CAD (ICAD). Med apoptozo kaspaza-3 cepi inhibitor ICAD, s tem sprosti aktivni encim CAD, kar povzroči hitro fragmentacijo jederne DNA (Dash, 2005).

#### 2.1.2 Nekroza

Nekrozo so dolgo opisovali kot posledico kemičnega stresa, kot naključno in nekontrolirano smrt. Nedavno so odkrili, da je ta oblika celične smrti dobro kontrolirana in programirana kot apoptoza ter odvisna od kaspaz. Je pomemben način celične smrti, ki je tako patološko kot fiziološko koristna. Nekrotična celična smrt ni posledica ene dobro znane signalne kaskade, ampak je rezultat sodelovanja med več biokemijskimi in molekularnimi dogodki na več celičnih nivojih. Nedavni podatki kažejo, da so serinsko/treoninske kinaze RIP1, ki vsebujejo domeno smrti, morda centralni začetniki. Kalcij in reaktivne kisikove spojine (ROS) so glavni faktorji med propagacijsko in izvršitveno fazo nekroze; direktno ali indirektno izzovejo poškodbo proteinov, lipidov in DNA. Nekrotično umiranje celic začne pro-vnetno signalno kaskado z aktivnim sproščanjem vnetnih citokinov in z razlitjem celične vsebine v okolico, ko celica lizira. Nekroza je mehanizem ubijanja tumorskih celic, ki so razvile odpornost na apoptozo (Festjens in sod., 2006).

Nekrozo lahko prepoznamo po posebnih morfoloških značilnostih: celica nabrekne, celični organeli se razširijo in razpadejo, plazmatska membrana se pretrga, celica lizira brez nastanka veziklov. Zaradi zgodnje izgube integritete plazmatske membrane lahko iz zunajceličnega prostora vstopijo ioni in tekočina, ki povzroči nabrekanje celice in organelov. Celična vsebina se sprostí v medcelični prostor in poškoduje sosednje celice ter povzroči vnetni odgovor v tkivu (Festjens in sod., 2006; Hotchkiss in sod., 2009; Proskuryakov in sod., 2003).

Morfološke značilnosti nekroze so pripeljale do predpostavke, da je ta oblika celične smrti pasivna in nekontrolirana. Kakorkoli, ti zaključki ne upoštevajo fenomenov, kjer je nekroza kontroliran proces aktiviran med specifičnimi fiziološkimi in patološkimi stanji (Proskuryakov in sod., 2003).

Nekrozo lahko inducirajo različni virusi, bakterije in protozoi. Lahko je aktivirana z bakterijskimi toksini in elementi imunske obrambe, kot je komplement, aktivirani naravni ubijalci in peritonealni makrofagi. Nekroza v celicah, ki se nahajajo v mukusu, je lahko inducirana s patogeni, kar olajša invazijo patogenov skozi vneto površino. V primeru znotrajceličnega patogena lahko nekroza prepreči apoptozo in s tem širjenje patogena (Proskuryakov in sod., 2003; Festjens in sod., 2006).

Nekrotična smrt ni samo posledica patoloških dogodkov, ampak je komponenta nekaterih fizioloških dogodkov. Med celično obnovo črevesja k normalni izgubi celične mase prispevata tako apoptoza kot nekroza. Nekroza ima tudi pomembno vlogo pri folikularnem dozorevanju med oogenezo in pri negativni selekciji v imunskem odgovoru. Tudi genetski eksperimenti so potrdili, da nekroza lahko zamenja apoptozo med normalnim razvojem (Proskuryakov in sod., 2003).

Na koncu nekrotskega procesa se aktivirajo proteaze. Pri nekaterih vzorcih nekroze pri propadu celice sodelujejo kaspaze, vendar pri večini primerov do nekroze vodi inhibicija kaspaz. Med proteazami, ki so pomembne za nekrozo pa so kalpaini, katepsini in serinske proteaze, vendar njihove celične tarče še niso povsem pojasnjene (Proskuryakov in sod., 2003).

### **2.1.3 Avtofagija**

Beseda avtofagija je grškega izvora in pomeni pojesti (»phagy«) sam sebe (»auto«). Najprej je bila uporabljena za strukture, ki so bile vidne pod elektronskim mikroskopom in so bile kot enojni, z dvojno membrano obdani lizosomalni vezikli, ki so vsebovali citoplazmatske dele, vključno z organeli v različnih fazah razpada (Hotchkiss in sod., 2009).

Avtofagija je proces, kjer celice reciklirajo svoje lastne neesencialne, nepotrebne ali poškodovane organele in makromolekularne komponente. Je prilagodljiv odgovor na stres, kot je pomanjkanje hrane, in preskrbi celico z metaboliti, ki jih porabi kot vir energije. Avtofagija ima vlogo pri preprečevanju rasti tumorjev, odstranitvi toksičnih, napačno zviti proteinov in znotrajceličnih mikroorganizmov ter pri predstavitvi antigenov (Hotchkiss in sod., 2009).

Glede na mehanizem nastajanja avtofagnih vakuol in glede na to kako lizosomi dobijo material za razgradnjo, ločimo tri tipe avtofagije:

1. avtofagija s šaperoni
2. makroavtofagija
3. mikroavtofagija (Hotchkiss in sod., 2009; Bursch in sod., 2008)

#### 2.1.3.1 Avtofagija s šaperoni

Avtofagija s šaperoni (Chaperone-mediated autophagy - CMA) je lizosomalna pot proteolize, ki je odgovorna za razgradnjo 30 % citosolnih proteinov pri daljši izpostavitvi pomanjkanja hrane. Molekularni šaperoni v citosolu in lumnu lizosoma stimulirajo to proteolitično pot. Šaperoni v citosolu razvijejo substratne proteine za translokacijo preko lizosomalne membrane, medtem ko so šaperoni v lumnu lizosoma verjetno odgovorni, da potegnejo substratni protein preko membrane. Posebnost substratnih proteinov, ki so razgrajeni po tej poti je, da vsebujejo pentapeptidni motiv KFERQ ali soroden temu (Bursch in sod., 2009; Knecht in Salvador, 2005).

#### 2.1.3.2 Makroavtofagija

Makroavtofagija je mehanizem, ohranjen med evkariotskimi celicami, ki se začne z nastankom multimembranske vakuole imenovane avtofagosom, ki se na koncu zlije z lizosomom, da razgradi substrat (Escatline in sod., 2009).

#### 2.1.3.3 Mikroavtofagija

Mikroavtofagija je prenos citosolnih komponent v lizosom z neposrednim vdorom v membrano lizosoma, kjer posledično vzbrstijo vezikli same lizosomalne membrane v lizosomski lumen. Ta proces je topološko enak procesu pri nastanku multivezikularnih teles, ki pa so drugačna od tistih, ki nastanejo pri eksocitozi, ker vsebujejo kisli lumen in aktivne zrele proteaze (Cuervo, 2004).



## 2.2 ZGRADBA IN FUNKCIJA HRUSTANČNEGA TKIVA

Hrustanec je kompaktno vezivno tkivo, ki je neoživčeno in neožiljeno ter ima specifične biomehanske lastnosti. Sestavljeno je iz specializiranih celic imenovanih hondrociti, ki predstavljajo 1-5 % tkiva in proizvajajo ekstracelularni matriks, ki je sestavljen iz kolagenskih vlaken, elastina, proteoglikanov in drugih proteinov ter vode (Bhosale in Richardson, 2008).

Hrustanec najdemo v telesu na več mestih: na sklepni površini kosti, na rebrih, ušesu, nosu, na bronhialnih ceveh in medvretenčnih diskih.

Glede na relativne deleže snovi, ki sestavljajo izvencelični matriks, ločimo tri vrste hrustanca: hialini hrustanec, elastični hrustanec in fibrilarni hrustanec.

### 2.2.1 Hialini hrustanec

Hialini hrustanec ima določeno elastičnost in fleksibilnost in je bisernato modre barve. Ne vsebuje živcev in žil ter limfnega sistema, zato so celice v hrustančnem matriksu zaščitene pred imunološkimi reakcijami. Je prevladujoča oblika hrustanca. Običajno je sklepni hialini hrustanec debelejši od 6 mm (Kregar, 2008).

Izvencelični matriks vsebuje proteoglikane (10-20 %), kolagenska vlakna (10-20 %), elastin, druge proteine matriksa in lipide ter seveda vodo (75-80 %). Proteoglikani vežejo hondroitin sulfat ali/in keratin ter tako tvorijo glikozaminoglikane. Med kolageni prevladuje kolagen tipa II (90-95 %), vendar lahko najdemo tudi majhno količino kolagena tipa IX in XI. Kolagenska vlakna so potrebna, ker dajejo hrustancu raztežno moč ter obliko ter imobilizirajo vodo in proteoglikane znotraj hrustanca (Bhosale in Richardson, 2008).

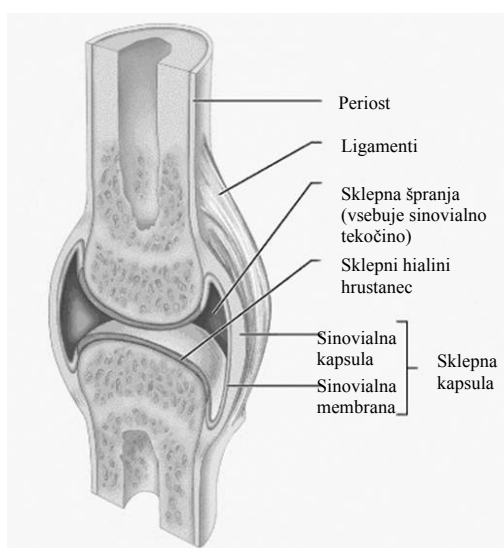
Sklepni hondrociti so ločeni drug od drugega in so navidezno skriti v prostorčkih, napolnjenih s tekočino, imenovanih lakune. Tvorijo osnovno enoto tkiva – hodron. Ponavadi periferne lakune vsebujejo eno celico, medtem ko lakune v sredini hrustanca lahko vsebujejo tudi več celic (2 ali 3). Hondrociti so odgovorni, da izvencelični matriks obdrži svojo funkcijo. Jedro hondrocitov je okrogle ali elipsoidne oblike. Ker je osnovna naloga hondrocitov izločanje izvenceličnega matriksa, je dobro razvit Golgijev aparat, ki se v fazi sinteze izvenceličnega matriksa še dodatno poveča. V citoplazmi se nahajajo podolgovati mitohondriji, včasih tudi lipidne kapljice in glikogen (Lin in sod., 2006).

Sestava hialinega hrustanca oblikuje asimetrični gel. Ločimo lahko 4 plasti, ki se razlikujejo v distribuciji in orientaciji celic in kolagenskih vlaken. Vsaka plast ima svojo funkcijo, ki se ob poškodbi tkiva spremeni ali izgubi. Od sklepne špranje proti kosti lahko

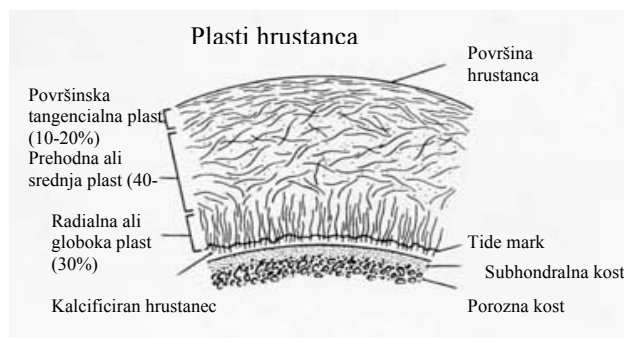
najdemo površinsko tangencialno plast, prehodno (srednjo) plast, radialno (globoko) plast in kalcificirano hrustančno plast. V tangencialni plasti so celice majhne, sploščene in paralelne na površino. V najbolj površinskem delu te plasti ni celic. V srednji coni so celice že malo večje in jih lahko najdemo posamezno ali v skupinah. V radialni plasti so celice in vlakna orientirane pravokotno na površino hialinega hrustanca, so večje in razporejene v stolpce. Nato sledi meja med kalcificirano hrustančno plastjo in ostalim nekalcificiranim hrustancem. V kalcificirani plasti so majhne žilice, ki priskrbijo prehrano za hondroците v tej plasti, ki deluje kot pregrada med kostjo in nekalcificiranimi plastmi (Baroli, 2008; Kregar, 2008).

## 2.2.2 Sklep

Najbolj preprost sklep je gibljiva zveza dveh različnih kosti, sinovialne kapsule, sinovialne membrane in sinovialne tekočine. Na zunanji strani sinovialne kapsule so kite, vezi in mišice, ki dajejo sklepu stabilnost. Sinovialna kapsula skupaj s sinovialno membrano tvori sklepno kapsulo (Baroli, 2008).



Slika 6: Sestava sklepa (prirejeno po Singh, 2007)



Slika 7: Sestava hrustanca (prirejeno po Hollister, 2005)

Površine obeh koncev kosti so delno prekrite s hialinim hrustancem. Kjer se hrustanec konča, se začne sinovialna membrana, ki omejuje sklepno votlino. Sinovialna membrana je sestavljena iz štirih plasti celic, imenovanih sinoviocyte in je s sprednje strani obdana s sinovialno tekočino (Kregar, 2008).

Sinovialna membrana ima več funkcij: reguliranje difuzije tekočin na notranji in zunanji strani sklepne špranje, odstranjevanje in čiščenje nečistoč znotraj sklepa, izločanje hialuronske kisline, imunoglobulinov in lizosomalnih encimov, kontroliranje sestave sinovialne tekočine, podmazovanje sklepov in reguliranje imunoloških dogodkov (Kregar, 2008).

Sinovialna tekočina je prozorna in viskozna tekočina, ki nastane z ultrafiltracijo krvi, in je obogatena z molekulami, ki jih izločajo sinoviocyte. Sestavljena je iz malih molekul kot so glukoza, urea, elektroliti, plazemski proteini majhne molekulske teže, glikozaminglikani, proteoglikani in makrofagne celice. Sinovialna tekočina je osnoven vir hranil za hondrocite sklepnega hrustanca, ki so nameščeni med kalcificirano cono in tekočino (Kregar, 2008).

Pri normalnih pogojih je proliferacija hondrocitov in penetracija drugih celičnih tipov iz sklepnega prostora ali subhondralne kosti omejena. Zaradi odsotnosti žilnega sistema v hrustančnem tkivu, so hondrociti odvisni od difuzije hranil in metabolitov iz sklepne površine ali subhondralne kosti. Glukoza služi kot glavni energetski vir za hondrocite in kot pomemben prekurzor za sintezo glukozaminglikanov (Otero in Goldring, 2007).

### **2.2.3 Spremembe v okuženih sklepih**

Okužba z *M. synoviae* je klinično podobna revmatoidnemu artritisu pri ljudeh (Jordan, 1985) in vključuje celoten sinovialen sklep: hrustanec, sinovium in kost. Celice v vsakem od teh tkiv so lahko tarča okužbe ali poškodbe in lahko tudi odgovorijo na okužbo, posledica česar je propad hrustanca. Za propad hrustanca sta značilni dve fazi: 1) biosintetska faza, med katero hondrociti poskušajo obnoviti poškodovan zunajcelični matriks in 2) faza propadanja, kjer hondrociti proizvedejo aktivne encime, ki razkrojijo matriks, sinteza matriksa je inhibirana in je tako posledično erozija hrustanca pospešena (Sandell in Aigner, 2001).

V normalnem, odraslem hrustancu, hondrociti sintetizirajo komponente matriksa zelo počasi. Biosinteza je stimulirana z različnimi anabolnimi citokini in rasnimi faktorji. V normalnem hrustancu je ravnotežje med sintezo in degradacijo primerno, medtem ko je v okuženem tkivu to razmerje moteno (Del Carlo in Loeser, 2008).

V okuženem tkivu se zgodijo fenotipske spremembe tkiva, ki so posledica sprememb v izražanju genov v hrustančnih celicah. Okužba povzroči izražanje celičnih faktorjev, ki stimulirajo celično smrt in sintetizirajo drugačno sestavo izvenceličnega matriksa. Ustavljena je tudi sinteza nekaterih pomembnih komponent v zdravem tkivu: agrekan in kolagen tipa II, namesto katerega pa se sintetizirajo kolageni tipa I, III in V. Nekateri hondrociti se dediferencirajo in dobijo fibroblastom podoben fenotip (Del Carlo in Loeser, 2008).

Do sedaj še ni podatkov, da *M. synoviae* vstopa v hondrocite vnetih sklepov. Walker in sod. (1978) so poročali, da je bila *M. synoviae* v citoplazmi adipoznih (maščobnih) celic. Sinovialne celice so kazale potencial razmnoževanja in so vsebovale več granuliranega endoplazmatskega retikuluma in inkluzije lipidov. V povečanih fibroblastih (tetivne ovojnice) so bile v citoplazmi lipidne inkluzije. Ni še bilo dokazano, da *M. synoviae* invadira hondrocite *in vivo* (čeprav je to verjetno), vendar pa je bilo le-to dokazano *in vitro* (Dušanić in sod., 2009). Dokazi invazije *in vivo* pa so za *M. pulmonis*, ki invadira hrustanec in hondrocite v sklepih podgan (Kohn in sod., 1982; Kohn in Chinookoswong, 1989).

### 2.3 MIKOPLAZME

Mikoplazme so najmanjši organizmi, prokarionti, ki so sposobni samostojnega razmnoževanja. Od drugih bakterij se fenotipsko ločijo, saj so zelo majhne, nimajo celične stene, obdaja jih le plazmatska membrana in imajo razvite le mehanizme, nujno potrebne za metabolizem in reprodukcijo. Zaradi odsotnosti celične stene mikoplazme uvrščamo v posebno skupino imenovano *Mollicutes*, kar v latinščini pomeni »mehka koža«. Prvič so bile opisane pred 110 leti, sedaj pa je znanih več kot 180 vrst (Razin in sod., 1998; Jordan, 1985; Rottem in Naot, 1998).

Mikoplazme so zaradi odsotnosti celične stene dominantno okrogle oblike, vendar pa je veliko predstavnikov razreda *Mollicutes* hruškaste ali stekleničaste oblike in imajo na vrhu strukture, filamente različnih dolžin in oblik. Odporne so na antibiotike, ki prizadenejo sintezo celične stene. Mikoplazemske celice so velike od 0,3 – 0,5 µm v premeru (Lockaby in Hoerr, 1999), njihov volumen pa je 10 % volumna bakterije *E. coli*. Tudi velikost genoma, ki je v obliki dvoverižne krožne DNA, je primerna glede na velikost celice in se giblje med 580 kbp (*M. genitalium*) in 1380 kbp (*M. mycoides*) ter vsebuje vsaj 800 genov. Majhen genom pojasnjuje tudi zreducirane biosintetske zmožnosti in odvisnost mikoplazem od gostitelja. Značilno imajo mikoplazme nizko vsebnost baznih parov G + T v genomu, od 24 do 33 % genoma, razen redkih izjem. Velik delež genoma vsebuje gene za adherenco na gostiteljeve celice in transport hranil iz njih. Rezultati analiz

(sekvenciranje nukleotidnega zaporedja) genomov mikoplazem *M. genitalium* in *M. pneumoniae* so pokazali, da ti genomi ne vsebujejo genov za sintezo aminokislin in maščobnih kislin, zato so le-te esencialne za mikoplazme in so pomembna komponenta kompleksnega hranilnega medija. Vendar pa slaba rast mikoplazem velikokrat ni posledica pomanjkanja specifičnih hranilnih komponent, ampak prisotnost toksičnih komponent za mikoplazme. V nasprotju z ostalimi bakterijami, večina mikoplazem za rast potrebuje holesterol za sintezo in stabilnost plazmatske membrane, ki ga pridobijo iz okolja ali iz gostitelja. Ti organizmi uporabljajo alternativni genetski kod, kjer kodon UGA kodira aminokislino triptofan, namesto običajnega stop kodona, kar je značilno za mitohondrije (Razin in sod., 1998; Lockaby in Hoerr, 1999).

Mikoplazme so v naravi razširjene kot paraziti ljudi, sesalcev, ptic, plazilcev, rib, členonožcev in rastlin. Glavni habitati človeških in živalskih mikoplazem so površine sluznic respiratornega in urogenitalnega trakta, oči, prebavnega trakta, mlečnih žlez in sklepov. Okužbe, ki jih povzročajo, so običajno blage in kronične, poškodbe so najverjetneje posledica vnetja in imunskega odziva, ki škoduje tkivu gostitelja (Razin in sod., 1998). Najprej je bilo znano, da invadirajo le v polimorfonuklearne levkocite in makrofage, kasneje pa je bilo dokazano, da invadirajo in preživijo tudi v ne-fagocitnih celicah (Razin in sod., 1998; Rottem in Naot, 1998; Dušanić in sod., 2009).

V razred *Mollicutes* uvršamo tri glavne taksonomske družine: *Mycoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*. Najbolj pomembne patogene vrste za perutnino, ki povzročajo največje ekonomske izgube, najdemo v rodu *Mycoplasma*, družine *Mycoplasmataceae*: *Mycoplasma gallisepticum* in *M. synoviae* pri puranih in kokoših ter *M. melagridis* in *M. iowae* pri puranih (Razin in sod., 1998; Jordan, 1985; Kleven in Yoder, 1989).

Za številne vrste mikoplazem je znano, da pri različnih sesalcih in ptičih povzročajo okužbo respiratornega in urogenitalnega trakta ter vnetja sklepov, pri nekaterih mikoplazmah, vključno z *M. synoviae*, pa lahko pride tudi do sistemske okužbe (Lockaby in Hoerr, 1999). Ena izmed najpomembnejših patogenov perutnine, ki jih uvršamo v to skupino, je prav *Mycoplasma synoviae*, ki rejcem kokoši in puranov povzroča ekonomske izgube, saj zavira rast in število živali, stopnjo valitve in zmanjša produkcijo jajc (Dufour-Gesbert in sod., 2006; Marois in sod., 2005). Prenos mikoplazem je lahko vertikalni, preko jajc, ali horizontalni, direktno med prenašalci in občutljivimi ptiči ali indirektno preko ljudi, divjimi živalmi ali morda kontaminirano opremo (Marois in sod., 2005).

*Mycoplasma synoviae* pri kokoših in puranih najpogosteje povzroča okužbo zgornje dihalne poti, kjer pa v večini primerov ni izraženih kliničnih znakov. V napredovanju

bolezni včasih pride tudi do okužbe spodnjega dihalnega trakta, vnetja zračnih vreč (airsacculitis) in pri nekaterih pogojih tudi do infekciозnega sinovitisa (Lockaby in sod., 1998; Kawakubo in sod., 1980). Lahko pride tudi do sistemske okužbe, kjer so prizadeti tudi notranji organi.

Infekciозni sinovitis je akutna ali kronična okužba kokoši in puranov ter povzroči predvsem vnetja sinovialnih membran sklepov (sinovitis), kitnih ovojníc (tendovaginitis), povečane količine sinovialne tekočine ali vnetje sluznih vrečic na prsnici (bursitis) (Morrow in sod., 1990; Lockaby in sod., 1998; Narat in sod., 1998).

Pomemben korak pri uspešni kolonizaciji in patogenezi mikoplazem je njihova sposobnost, da se primejo na površino epitelnih celic. Adherentnost je glavni virulentni faktor mikoplazem, saj sevi, ki se niso sposobni pritrđiti niso virulentni (ali so mnogo manj virulentni). Bakterije z gostiteljsko celico povezujejo membranski proteini – citadhezini. Najznačilnejši predstavnik te skupine proteinov je citadhezin P1, glavni adhezin patogena *M. pneumoniae*, ki prepozna sialično kislino na gostiteljevih celicah (epitelne celice dihalnega trakta pri človeku) (Rottem in Naot, 1998; Lockaby in Hoerr, 1999; Benčina, 2002).

Za patogene vrste ptičjih mikoplazem je značilno, da sintetizirajo hemaglutinine, ki jim omogočajo pritrđitev na celice gostiteljev (Benčina, 2002). *M. synoviae* in *M. gallisepticum* se pritrđita na receptorje, ki vsebujejo ostanke sialične (nevraminske) kisline. Obe proizvajata tudi nevraminidazo, ki odceplja nevraminsko kislino (Berčič in sod., 2008).

Čeprav so domnevali, da mikoplazme ostanejo pritrđene na površini epitelnih celic, nedavne študije kažejo, da imajo nekatere vrste mikoplazem razvit mehanizem za vstop v gostiteljeve nefagocitirajoče celice in lahko znotraj njih preživijo (Rottem, 2003; Rottem in Naot, 1998; Dušanič in sod., 2009). Znotrajcelični prostor je dobro zaščiten pred imunskim sistemom in delovanjem različnih antibiotikov (Rottem, 2003). Pri proučevanju vdora bakterij v gostiteljeve celice je pomembno ločiti med mikroorganizmi, ki so pritrđeni na celice in tistimi, ki so v celicah. Na splošno je gentamicinski test invazivnosti najbolj uporaben za ločitev med znotrajceličnimi in zunajceličnimi bakterijami. Pri tem testu so zunajcelične bakterije ubite z gentamicinom, medtem ko so znotrajcelične zaščitene pred antibiotikom, zaradi omejene penetracije gentamicina v evkariotske celice (Rottem, 2003). S pomočjo tega testa in z imunofluorescenco so Dušanič in sod. (2009) dokazali, da *Mycoplasma synoviae* v pogojih *in vitro* invadira v kokošje eritrocite (CER), kokošje embrijske fibroblastne celice (CEC) in kokošje hrustančne celice (CCH).

### 2.3.1 Značilnosti infekciозnega sinovitisa

Infekciозni sinovitis, ki ga povzročijo mikoplazme, je razširjen po vsem svetu in je prisoten pri kokoših in puranih vseh starosti. Povzroča ga bakterija *Mycoplasma synoviae*. Klinični znaki sinovitisa so prsni žulji, bled in upadel greben, ohromelost, nakodrano perje. Živali so dehidrirane, apatične, imajo otekline sklepe na nogah in krilih ter nožne blazinice. Zmanjšana je produkcija jajc in kvaliteta lupine (Kerr in Olson, 1970).

Infekciозni sinovitis ima dve fazi: akutno in kronično. Značilnosti akutne faze so otekline sklepi, vnetje sinovialne membrane in tetive, povečana količina sinovialne tekočine, anemija. Te spremembe se pojavijo po 1-3 tednih po okužbi. Po akutni fazi nastopi kronična faza. Za njo je značilna tanjša plast hrustanca, kjer pa nastanejo tudi erozije. Očitne spremembe so vidne po 7-8 tednih po okužbi (Kerr in Olson, 1970).



Slika 8: Leva noga po inokulaciji v stopalo z *M. synoviae* in zdrava desna noga (Lockaby in sod., 1998: 183)

Okužba z *M. synoviae* povzroča vnetja z izločki, ki je prisotno v mehkih tkivih sklepa, kitah in sklepni špranji. Prisotno je perivaskularno vnetje in spremembe v sklepnem hrustancu. Področja nekroze se združijo v erozije na sklepni površini, ki se potem razširijo na kost (Kerr in Olson, 1970).

V akutno prizadetih sklepih postanejo sinovialne celice hipertrofične in hiperplastične. Sinovialna membrana je edematozna in vsebuje folikularna žarišča s heterofilci. Poveča se količina sinovialne tekočine. Sinovialni infiltrati vsebujejo limfocite in plazmatke, ki na koncu postanejo granulirani (Lockaby in Hoerr, 1999; Kerr in Olson, 1970). Prevladujejo T limfociti (CD4 in CD8), ki imajo tudi bistven pomen pri nastanku avtoimunskih bolezni (Narat, 1997). Preliminarni podatki kažejo, da so v sinovialni tekočini prisotna tudi protitelesa, ki reagirajo z epitopi hrustančnih celic. Ti epitopi so verjetno celični proteini, ki postanejo dostopni za protitelesa, ko celice propadejo.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 PRIPRAVA KULTURE *M. synoviae* WVU 1853

Kulturo *M. synoviae* smo gojili v modificiranem tekočem Frey-evem mediju, ki je vseboval 10 % prašičjega seruma (Invitrogen, ZDA), 0,1 % nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) in 0,1 % cistein hidroklorida (Sigma-Aldrich, Nemčija). Kulture smo gojili pri 37–38°C do logaritemske faze rasti ( $10^7$  do  $10^8$  CFU/ml).

#### 3.2 GOJENJE CELIČNIH KULTUR

##### 3.2.1 Gojenje primarne kulture hondrocitov

Hrustančno tkivo je bilo najprej encimsko razgrajeno. Izolirane hrustančne celice (Dušanić in sod., 2009), ki smo jih uporabili za naš poskus, so bile zamrznjene v prvi, drugi ali tretji pasaži. Po odtajanju smo celice gojili v mediju s sledečo sestavo:

- 90 % D-MEM
- 7,5 % FBS
- 2,5 % kokošjega seruma

##### 3.2.1.1 Odmrzovanje

V 14 ml sterilno centrifugirko smo pripravili 5 ml ogretega medija za gojenje celic. Epruvetko za zamrzovanje z zamrznjenimi hondrociti smo vzeli iz posode s tekočim dušikom in jo na hitro odtajali v vodni kopeli na 37°C, dodali 1 ml medija, predhodno ogretega na 37°C, resuspendirali celično suspenzijo in jo prestavili v prej pripravljen medij v epruveti.

Odmrznjene hrustančne celice smo centrifugirali 5 minut pri 1300 rpm pri sobni temperaturi. Nato smo odstranili supernatant ter usedlino s pipeto resuspendirali v 1 ml svežega medija. Suspenzijo s celicami smo prenesli v gojitveno posodico, kamor smo že predhodno dodali 5 ml gojitvenega medija. Posodo smo dobro zaprli, označili ter jo dali v inkubator s temperaturo 37°C in 5 % CO<sub>2</sub>.

Celice smo vzdrževali v CO<sub>2</sub> inkubatorju, pri temperaturi 37°C in 5 % CO<sub>2</sub>. Po potrebi smo celicam zamenjali gojitveni medij, ki vsebuje barvilo fenol rdeče, ki ob spremembi pH spremeni barvo in tako lahko prepoznamo, kdaj je medij izrabljen. Hrustančne celice so pritrjena kultura. Ko so bile vsaj 70 % konfluentne, smo celice tripsinizirali. Tretirali smo jih z 0,05 % encimom tripsin, ki celice odlepi od dna gojitvene posode ter razrahlja medcelične stike.



Celice smo najprej odstranili izrabljen medij ter ga nadomestili z 10 ml raztopine HBSS za spiranje. HBSS odstrani kalcijeve ione, ki onemogočajo tripsinu njegovo delovanje. Ko smo HBSS odstranili, smo dodali 5 ml 0,05 % tripsina/EDTA ter 4 minute inkubirali na 37°C. Po inkubaciji smo pod mikroskopom preverili ali so se celice odlepile. Tripsinizirane celice smo s pipeto resuspendirali, da smo popolnoma prekinili medcelične stike ter jih predstavili v 5 ml že vnaprej pripravljenega gojitvenega medija, ki inaktivira delovanje tripsina. Suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 1300 rpm, odstranili supernatant ter usedlino resuspendirali v svežem mediju za nadaljnje gojenje celic.

### 3.2.1.2 Štetje celic

Za preverjanje števila celic, ki smo jih morali nasaditi na plošče, smo uporabljali standardno metodo štetja s tripanskim modrilom. Iz homogenizirane celične suspenzije smo odvzeli 20 µl vzorca ter mu dodali enak volumen tripanskega modrila. Tripansko modrilo prodre le v mrtve celice in jih obarva modro. Tako lahko ločimo mrtve in žive celice. 20 µl vzorca celic s tripanskim modrilom smo prenesli pod krovno steklo Bürker-Türkove šteвне komore. Po štetju celic smo izračunali skupno število celic v celični suspenziji po formuli:

$$N = n \times R \times V \times 10^4$$

N – skupno število celic

n – povprečno število celic v štirih kvadratih v polju Bürker-Türkove šteвне komore

R – redčitveni faktor zaradi mešanja s tripanskim modrilom

V – volumen celične suspenzije od koder smo odvzeli 20 µl vzorca

### 3.2.1.3 Zamrzovanje in shranjevanje celic

Celice, ki jih nismo potrebovali za nadaljnje gojenje, smo zamrznili. Najprej smo ugotovili skupno število celic v suspenziji ter se odločili za število celic, ki jih želimo zamrzniti v posamezni epruvetki za zamrzovanje. Ustrezen volumen smo centrifugirali 5 minut pri 1300 rpm. Celično usedlino smo resuspendirali v 900 µl gojitvenega medija ter suspenzijo predstavili v epruvetko za zamrzovanje, dodali 100 µl DMSO ter počasi resuspendirali. Epruvetke smo prenesli v posodo za počasno zamrzovanje MrFrosty ter 24h hranili na -80°C. Nato smo prenesli epruvetke v tekoči dušik (-196°C).

### 3.2.2 Gojenje suspenzijskih celic Jurkat

Celice Jurkat so celična linija, ki izhaja iz človeških levkemičnih limfocitov T. Na svoji površini imajo izraženih številno več receptorjev, ki sodelujejo pri celični smrti, kot zdrave celice. Prav zato so dober model za preučevanje apoptoze. Te celice smo uporabljali kot pozitivno kontrolo, saj je znano, da pri njih 5-fluorouracil inducira apoptozo.

Celice Jurkat smo najprej odmrznili po enakem postopku kot hrustančne celice. Ker so te celice suspenzijska kultura, smo ob menjavi medija celotno celično suspenzijo prenesli v 14 mililitersko centrifugirko ter centrifugirali 5 minut na 1300 obratov. Po centrifugiranju smo supernatant odstranili ter celično usedlino resuspendirali v 2 ml svežega gojitvenega medija. To suspenzijo smo prenesli v gojitveno posodico, kamor smo že predhodno dodali 8 ml kompletnega medija RPMI. Če je bilo celic preveč, smo suspenzijo celic razdelili v več gojitvenih posodic ali smo jih zamrznili.

Kompletni medij RPMI za gojenje celic Jurkat vsebuje:

- 90 % RPMI-1640 medija
- 10 % FBS.

## 3.3 OPTIMIZACIJA EKSPERIMENTALNIH POGOJEV

### 3.3.1 Določanje podvojitvenega časa in optimizacija števila celic

#### 3.3.1.1 Določanje podvojitvenega časa celic

Za določanje podvojitvenega časa celic Jurkat smo nasadili celice v 24-lukenjske plošče, in sicer 500  $\mu$ l celične suspenzije v posamezno luknjo. Začetna koncentracija celic je bila  $2 \times 10^5$  celic/luknjo. Po 24 in 48 urni inkubaciji smo odvzeli po 20  $\mu$ l predhodno resuspendiranega vzorca iz luknje ter prešteli celice po standardni metodi s tripanskim modrilom.

Podvojitveni čas celic smo določali, ker smo želeli nasaditi celice v plošče tako, da bo ob koncu inkubacije, ki bo trajala različno dolgo časa, v vseh luknjah enako število celic. Za vsak čas inkubacije smo predvideli torej drugačno začetno koncentracijo celic v luknji.

Za določanje podvojitvenega časa hrustančnih celic nismo naredili posebnega poskusa, saj smo ta podatek vedeli že iz predhodnih izkušenj v laboratoriju.

### 3.3.1.2 Optimizacija števila celic

Najprimernejše število celic v luknjah 96-lukenjske plošče za test XTT smo določili s spremljanjem naraščanja števila celic različnih začetnih koncentracij v optimizacijskem poskusu, ki je opisan v nadaljevanju (poglavje 3.3.2).

Število celic v luknjah 6-lukenjske plošče za test aktivnosti izražanja kaspaze-3 smo določili po navodilih proizvajalca »APOPCYTO kita«.

### 3.3.2 Primerljivost rezultatov štetja celic s pomočjo tripanskega modrila in testom XTT

V 96-lukenjsko ploščo smo nasadili hrustančne celice in celice Jurkat za 4 dni inkubacije. Imeli smo dve različni začetni koncentraciji celic:  $1 \times 10^4$  in  $4 \times 10^4$  celic na 200  $\mu$ l. Za vsak dan inkubacije smo za vsako od začetnih koncentracij imeli po dve ponovitvi za vsako metodo štetja. Vzorci, ki smo jih imeli za vsak dan inkubacije:

- 2x Jurkat celice s koncentracijo  $1 \times 10^4/200$   $\mu$ l za štetje s tripanskim modrilom
- 2x Jurkat celice s koncentracijo  $1 \times 10^4/200$   $\mu$ l za test XTT
- 2x Jurkat celice s koncentracijo  $4 \times 10^4/200$   $\mu$ l za štetje s tripanskim modrilom
- 2x Jurkat celice s koncentracijo  $4 \times 10^4/200$   $\mu$ l za test XTT
- 2x hrustančne celice s koncentracijo  $1 \times 10^4/200$   $\mu$ l za štetje s tripanskim modrilom
- 2x hrustančne celice s koncentracijo  $1 \times 10^4/200$   $\mu$ l za test XTT
- 2x hrustančne celice s koncentracijo  $4 \times 10^4/200$   $\mu$ l za štetje s tripanskim modrilom
- 2x hrustančne celice s koncentracijo  $4 \times 10^4/200$   $\mu$ l za test XTT

Celice Jurkat so suspenzijska kultura, zato smo 20  $\mu$ l vzorca za štetje lahko vzeli neposredno iz luknje plošče, hrustančne celice pa smo najprej tripsinizirali podobno kot je opisano za presajanje celic, le da smo tu združili izrabljen gojitveni medij, medij HBSS, s katerim smo spirali celice pred tripsinizacijo in usedlino celic po centrifugiranju. Vse skupaj smo centrifugirali 5 minut pri 1300 rpm, celično usedlino resuspendirali v 100  $\mu$ l medija ter odvzeli 20  $\mu$ l vzorca za štetje. Na ta način smo iz gojitvene luknje res zajeli poleg živih celic, ki so bile pritrjene na podlago, tudi vse mrtve celice.

## 3.4 NAČRT POSKUSA

### 3.4.1 Nasaditev hrustančnih in celic Jurkat v 6 in 96-lukenjske plošče

Celice za nasaditev v 6- in 96-lukenjske plošče smo šteli s standardno metodo, s tripanskim barvilom. Hrustančne celice smo najprej tripsinizirali, centrifugirali ter jih resuspendirali v določenem volumnu gojitvenega medija. Iz te suspenzije smo odvzeli

20  $\mu$ l za štetje. Prav tako smo celice Jurkat centrifugirali, jih resuspendirali v določenem volumnu RPMI medija z 10 % FBS ter odvzeli 20  $\mu$ l vzorca za štetje.

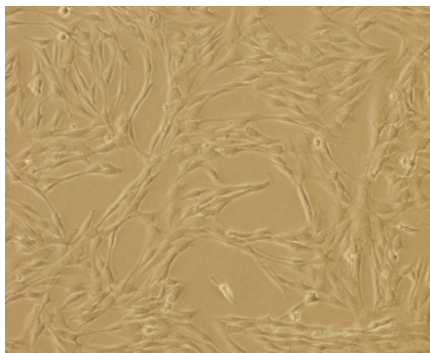
Ko smo izračunali koliko celic imamo in koliko jih potrebujemo za celoten poskus, smo po sklepnem računu izračunali, kakšen delež te celične suspenzije potrebujemo za test XTT za nasaditev v 96-lukenjske plošče ter ta delež prestavili v drugo centrifugirko in celice sprali z medijem brez fenol rdečega. Ostale celice smo uporabili za nasaditev v 6-lukenjske plošče za določanje stopnje aktivnosti kaspaze-3.

Po enodnevni inkubaciji smo celicam zamenjali medij.

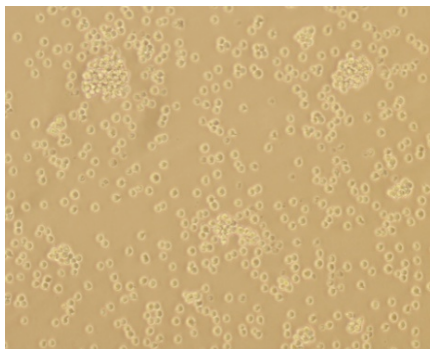
Iz lukenj, kjer so bili hondrociti, smo odstranili izrabljen medij skupaj s celicami, ki se niso pritrdile na dno, ter ga nadomestili z enakim volumenom svežega medija.

Pri celicah Jurkat, ki so suspenzijska kultura, smo celotno suspenzijo iz lukenj prenesli v epice ter centrifugirali 5 minut na 1300 rpm. Takoj po odstranitvi suspenzije iz lukenj smo le-to nadomestili z enakim volumenom svežega RPMI medija. Po centrifugiranju smo supernatant iz epic previdno odstranili, saj je celična usedlina bila zelo majhna. Usedlino smo resuspendirali v polovičnem volumnu medija iz lukenj ter suspenzijo ponovno prenesli v luknje.

A)



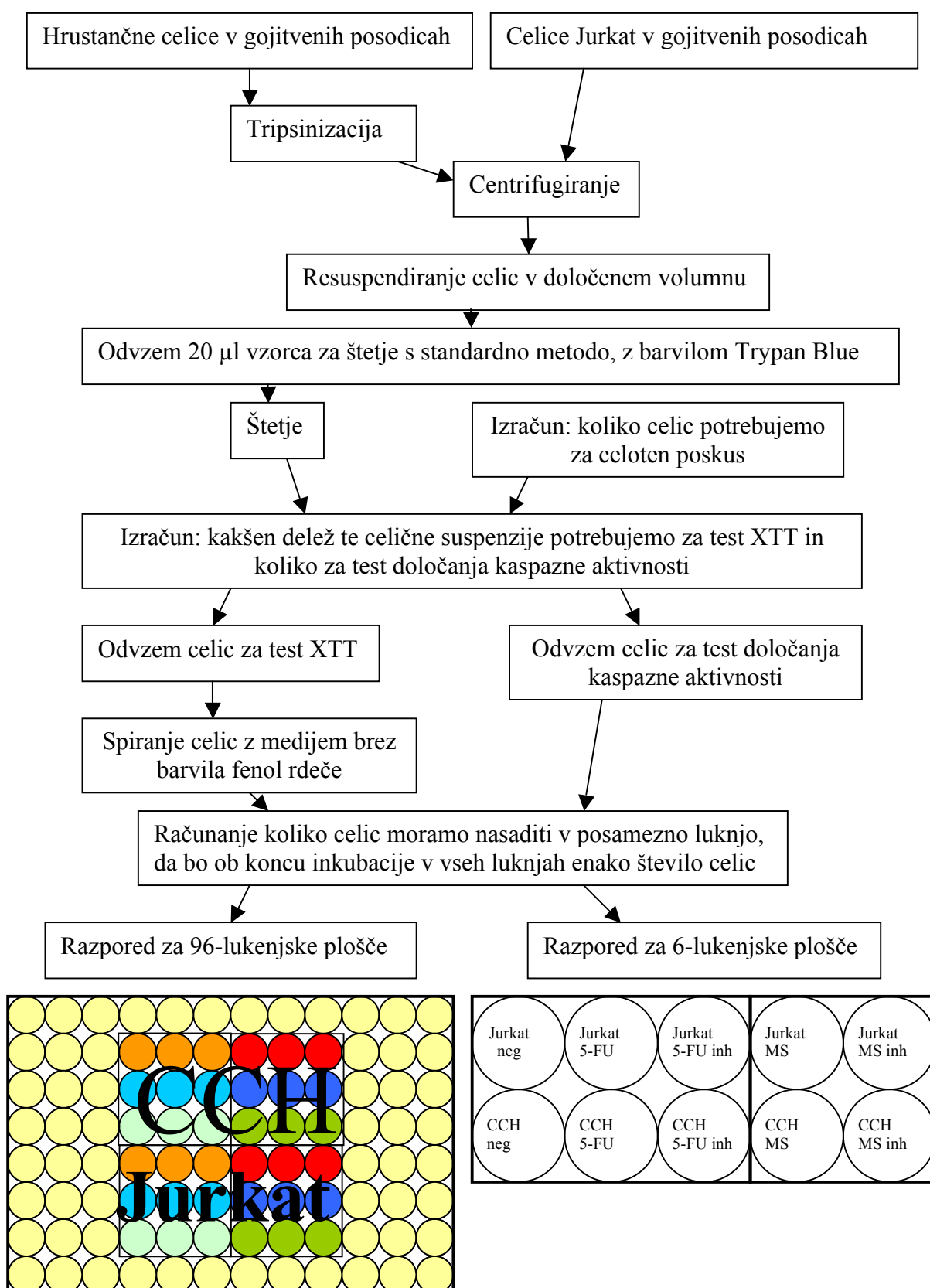
B)



Slikano pri povečavi 100x (mikroskop – Nikon eclipse TE2000-U)

Slika 9: Fotografije celic, ki smo jih gojili v gojitvenih posodicah

A) hrustančne celice, B) celice Jurkat.



Slika 10: Postopek za nasaditev hrustančnih celic in celic Jurkat v 6- in 96-lukenjske plošče. Rdeča barva je negativna kontrola, modra je inkubacija z 5-FU, zelena je okužba z *M. synoviae*. Svetle barve pomenijo 24 ali 72 ur inkubacije, temnejše barve pa 48 ali 96 ur. Luknje označene z rumeno barvo so bile napolnjene le z gojiščem brez celic. Vse skupaj smo ponavljali 3x.

### 3.4.2 Okužba celičnih kultur

#### 3.4.2.1 Okužba celic z *M. synoviae* WVU 1853

Bakterijsko kulturo *M. synoviae* WVU 1853, s katero smo izvedli vse teste, sem dobila od dr. Dušana Benčine, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živinorejo.

Kulturo *M. synoviae* WVU 1853, ki je bila v logaritemski fazi rasti ( $10^8$  do  $10^9$  CFU/ml) smo najprej premešali in tako bakterije enakomerno razporedili po gojišču. V 96-lukenjske plošče smo v določene luknje z 200  $\mu$ l celične suspenzije dodali 100  $\mu$ l bakterijske kulture, v 6-lukenjsko ploščo z 2 ml celične suspenzije pa 500  $\mu$ l iste kulture (*M. synoviae* WVU 1853). Po okužbi smo plošče narahlo pretresli ter jih prestavili v inkubator, namenjen celičnim kulturam, okuženimi z mikoplazmami. Po 24, 48, 72 ali 96 urni inkubaciji smo izvedli test XTT in pripravili vzorce za test določanja aktivnosti kaspaze-3.

Za inkubacijo celic v 96-lukenjski plošči smo uporabili gojitveni medij brez fenol rdečega, ker le-ta moti pri merjenju absorbance. Sestava tega medija je bila 90 % RPMI in 10 % FBS in je bila za hrustančne in celice Jurkat enaka.

#### 3.4.2.2 Inkubacija celic s 5-fluorouracilom (5-FU)

5-fluorouracil je znan kemoterapevtik in je dober induktor apoptoze. Uporabljajo ga za proučevanje programirane celične smrti. Mi smo ga uporabili kot pozitivno kontrolo v testu XTT, kjer smo pričakovali da bo povzročil smrt celic in v testu določanja kaspazne aktivnosti, kjer smo pričakovali, da bo v njegovi prisotnosti visoka kaspazna aktivnost, kar je pokazatelj inducirane apoptoze.

Založna raztopina 5-FU je bila 10 mg/ml, koncentracija potrebna za inkubacijo pa je 20  $\mu$ g/ml. Pred inkubacijo celic s 5-FU smo izračunali, da moramo v luknje 96-lukenjskih plošč, kjer je 200  $\mu$ l celične suspenzije, dodati 0,4  $\mu$ l založne raztopine 5-FU, v luknje 6-lukenjskih plošč z 2 ml celične suspenzije pa 4  $\mu$ l založne raztopine. Po dodatku 5-FU smo plošče narahlo pretresli ter jih dali v inkubator. Po 24, 48, 72 ali 96 urni inkubaciji smo izvedli test XTT in pripravili vzorce za test določanja aktivnosti kaspaze-3.

### 3.4.3 Test XTT

Test smo izvedli z uporabo »kita« *In vitro Toxicology Assay Kit, XTT based*, Sigma-Aldrich, TOX2.

Barvilo XTT je tetrazolijeva sol, topna v vodi. Mitohondrijske dehidrogenaze živih celic cepijo tetrazolijev obroč in nastane oranžen formazan, netopen v vodi. Absorbanco oranžnega produkta izmerimo spektrofotometrično.

S testom XTT smo spremljali respiratorno aktivnost živih celic, kar posredno kaže na njihovo število. Spremembo števila celic smo preverjali v času inkubacije 24h, 48h, 72h in 96h po začetku okužbe. V teh časovnih intervalih smo opravili test XTT po naslednjem protokolu:

1. v luknje 96-lukenjskih plošč smo dodali volumen barvila XTT, enak 20 % volumna celične suspenzije (k neokuženim celicam in celicam inkubiranimi z 5-FU smo dodali 40  $\mu$ l barvila XTT, k celicam, okuženim z *M. synoviae* pa 60  $\mu$ l barvila XTT).
2. ploščo smo narahlo pretresli
3. inkubirali smo 3 ure pri temperaturi 37°C
4. po inkubaciji smo ploščo ponovno narahlo pretresli
5. pri valovni dolžini 450 – 690 nm smo izmerili absorbanco

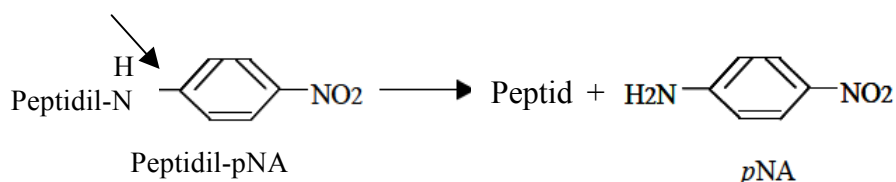
### 3.4.4 Test določanja aktivnosti kaspaze-3

Test za določanje aktivnosti kaspaze-3 smo izvedli z uporabo »kita« *»APOPCYTO test«* (MBL, 4800, USA).

#### 3.4.4.1 Princip delovanja testa

Kaspaza-3 je efektorska kaspaza, molekula, ki je skupna vsem oblikam signalnih poti apoptoze, zato je za določanje prisotnosti programirane celične smrti primerno izmeriti prav aktivnost tega encima.

Aktivne kaspaze prepoznajo 4-5 aminokislin v sekvenci substratne molekule, pri kateri je aspartat na C-terminalnem delu. Za kaspazo-3 je ta sekvenca DEVD (aspartat-glutamat-valin-aspartat) in kaspaza cepi takoj po drugem aspartatu. Pri tem testu je uporabljen sintetični substrat tetrapeptid-*pNA*. *pNA* je značka, ki je vezana na tetrapeptid DEVD.



Slika 11: Substrat, ki smo ga uporabljali pri določanju kaspazne aktivnosti. Kaspaza-3 cepi na označenem mestu.

Test, ki smo ga izvedli za določanje kaspazne aktivnosti, temelji na spektrofotometričnem merjenju razcepljenega substrata s kaspazo-3. Substrat je brezbarven, pNA pa je zelene barve.

Če je v vzorcu prisotna aktivna kaspaza-3, cepi ta substrat tako, da odcepi iz tetrapeptida značko pNA in vzorec se obarva zeleno, kar spremeni valovno dolžino, ki jo spektrofotometrično izmerimo. Absorbanca, ki jo dobimo je premosorazmerna s količino prostega, cepljenega pNA, kar pa je proporcionalno s kaspazno aktivnostjo oz. s količino aktivne kaspaze-3.

V kitu je tudi inhibitor DEVD-FMK, ki inhibira aktivnost kaspaze-3. Dodamo ga k vzorcem, da se prepričamo ali je absorbanca, ki smo jo izmerili res odraz aktivnosti kaspaze-3 ali na absorbanco vplivajo še kakšni drugi dejavniki. V vzorcih, kjer je dodan inhibitor, torej pričakujemo zmanjšano kaspazno aktivnost.

#### 3.4.4.2 Izvedba testa

Test za določanje aktivnosti kaspaze-3 smo izvedli po navodilih proizvajalca »APOPCYTO testa«.

Celice, ki smo jih inkubirali v 6-lukenjskih ploščah, smo pripravili za test določanja kaspazne aktivnosti. Vzorčili smo jih v času 24h, 48h, 72h in 96h po naslednjem postopku:

Celice Jurkat, smo v luknjah resuspendirali, sprali s HBSS, ter vse skupaj dali v epruveto.

Protokol za hrustančne celice:

1. najprej smo iz lukenj odstranili supernatant ter ga prenesli v centrifugirko
2. celice smo sprali s HBSS
3. celicam v luknji smo dodali 500 µl tripsina ter inkubirali 5 minut pri 37°C
4. po inkubaciji smo celice postrgali iz dna in jih resuspendirali
5. luknjo smo sprali s HBSS

Ko smo imeli vse celice, Jurkat in CCH, v centrifugirkah, smo te vzorce centrifugirali 5 minut pri 1300 rpm (TEHTNICA/CENTRIC 322A). Nato smo odstranili supernatant ter celično usedlino resuspendirali v 50 µl pufra, ki povzroči lizo celic. Celice s pufrom smo prestavili v 1,5 ml epice in jih čez noč pustili pri temperaturi -20°C. Po 24 urah smo vzorce odmrznili ter 5 minut centrifugirali pri 9105 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R) in temperaturi 4°C. Nato smo supernatant prestavili v manjše mikrocentrifugirke in to ponovno zamrznili pri temperaturi -20°C.



Ko smo zbrali vse vzorce, po vseh dneh inkubacije in vseh ponovitev, smo odvzeli vzorce za določanje koncentracije proteinov in nadaljevali s testom za določanje kaspazne aktivnosti kaspaze-3.

Pripravili smo 10 mM DTT. 10 µl 1M DTT smo resuspendirali v 990 µl 2X reakcijskega pufra. V vsako izmed lukenj v 96-lukenjski plošči smo dali 40 µl 10mM DTT ter 40 µl vzorca. V določene luknje smo dodali 1 µl inhibitorja DEVD-FMK, v vse luknje z vzorci pa 4 µl substrata DEVD-*p*NA. Luknje za standard smo pustili prazne. Za ozadje smo imeli 40 µl liznega pufra, 40 µl reakcijskega pufra in 4 µl substrata DEVD-*p*NA. Na stresalniku smo ploščo na rahlo pretresli in jo inkubirali 2h pri temperaturi 37°C.

Med inkubacijo smo si pripravili standard z različnimi koncentracijami *p*NA.

Po dve-urni inkubaciji, smo na ploščo dodali tudi standard, 100 µl standarda na luknjo, v luknje namenjene temu. Nato smo izmerili absorbanco s spektrofotometrom (BIOTEK, EL808) pri valovni dolžini 405 nm.

### **3.4.5 Določanje koncentracije proteinov po metodi po Bradfordu**

#### **3.4.5.1 Princip delovanja**

Metoda po Bradfordu je spektrofotometrična metoda, ki temelji na spremembi absorbance barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 (trifenilmetan). Barvilo se veže na primarne bazične in aromatske aminokisline proteinov, posebno na arginin. Barvne spremembe so odvisne od koncentracije proteinov v vzorcu: večja je koncentracija, večja je tudi sprememba barve. Barvilo Coomassie Brilliant Blue G-250 je v začetku rdeče barve in se z vezavo na proteine spremeni v modro barvo.

#### **3.4.5.2 Izvedba testa**

Vzorce, ki smo jih pripravili za test določanja kaspazne aktivnosti, smo redčili v razmerju 1:100 z destilirano vodo. Redčene vzorce smo nato nanesti na 96-lukenjsko ploščo. V vsako luknjo smo dali 160 µl vzorca (ali standarda) in 40 µl raztopine barvila (Biorad, 500-0006). Po 10 minutni inkubaciji in rahlem stresanju plošče, smo izmerili absorbanco s spektrofotometrom (BIOTEK, EL808) pri valovni dolžini 595 nm.

Vse vzorce smo pripravili v treh ponovitvah.

### **3.4.6 Statistična analiza podatkov**

Celotni test s štirimi dnevi inkubacije smo trikrat ponavljali. Za vsako vrsto vzorca smo naredili več ponovitev.

Pri testu XTT smo v enem sklopu štiridnevne inkubacije za vsak vzorec naredili po dve ali tri ponovitve, tako da smo ob koncu za vsak vzorec imeli 6 ali 8 ponovitev. Pri statistični obdelavi rezultatov (izmerjenih absorbancah) smo izločili za vsak vzorec najvišjo in najnižjo vrednost ter s pomočjo programa Excel izračunali aritmetično sredino in standardni odklon ter izrisali graf.

Za določanje aktivnosti kaspaze-3 smo imeli za vsak vzorec le po tri ponovitve. Izračunali smo povprečje in standardno napako ter izrisali graf.

Pri določanju koncentracije proteinov smo za vsak vzorec imeli po 9 ponovitev. Izračunali smo povprečje in standardno napako ter izrisali graf.

## 4 REZULTATI

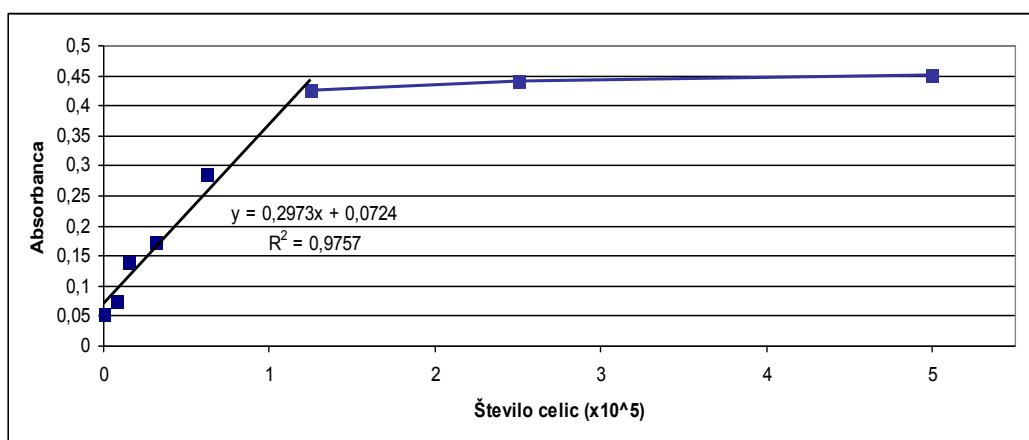
### 4.1 REZULTATI OPTIMIZACIJSKIH POSKUSOV

#### 4.1.1 Optimizacija števila celic za test XTT

Pred začetkom poskusa s katerim smo želeli pokazati vpliv bakterije *M. synoviae* na preživetje kokošjih hrustančnih celic in ali je vzrok za zmanjšano viabilnost teh celic apoptoza, smo morali optimizirati eksperimentalne pogoje.

Za pozitivno kontrolo smo uporabili celice Jurkat, ki sicer izhajajo iz človeških levkemičnih limfocitov T, vendar so dober model za proučevanje apoptoze. Ker so te celice bile prvič uporabljene v našem laboratoriju, smo večino optimizacijskih poskusov naredili s temi celicami, saj nismo imeli nobenih predhodnih izkušenj z njimi. Prav tako je z njimi lažje delat, saj so suspenzijska kultura.

V začetku smo želeli ugotoviti umeritveno območje testa XTT, zato smo celice Jurkat nasadili v različnih koncentracijah ter izmerili absorbanco po navodilih proizvajalca tega testa.



Celice Jurkat smo nasadili v različnih koncentracijah ter izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450-690 nm.

Slika 12: Umeritveno območje testa XTT – celice Jurkat

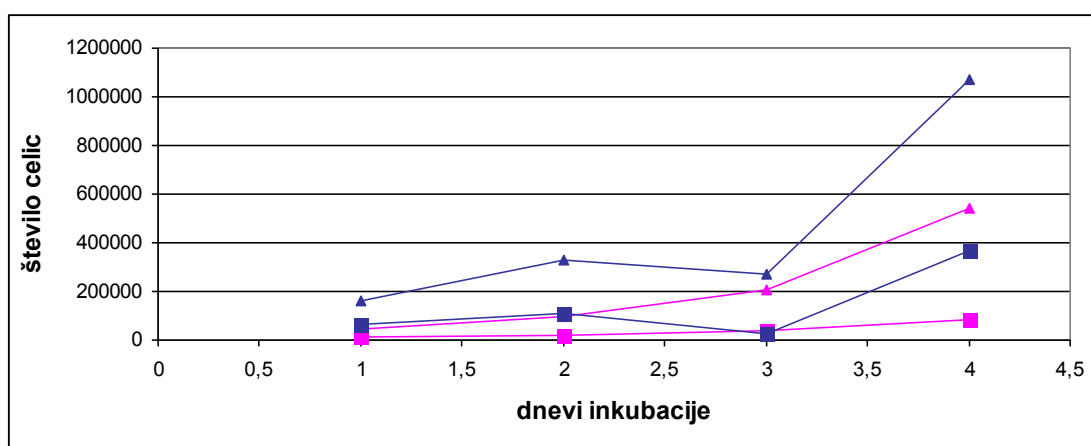
Na sliki 12 lahko vidimo, da se do števila celic  $1,25 \times 10^5$  absorbanca enakomerno povečuje, nato pa ostaja skoraj enaka, zato od tam naprej rezultati niso več tako zanesljivi.

#### 4.1.2 Primerjava med testom XTT in štetjem s tripanskim modrilom

Z rezultati tega poskusa smo želeli videti kakšne so razlike med obema načinoma štetja celic. V štirih dneh inkubacije celic smo spremljali naraščanje števila živih celic. Za oba

načina štetja celic smo imeli 2 različni začetni koncentraciji celic:  $1 \times 10^4$  celic/200  $\mu$ l gojišča na luknjo in  $4 \times 10^4$  celic/200  $\mu$ l gojišča na luknjo.

Celice Jurkat smo v dveh različnih začetnih koncentracijah nasadili, da smo spremljali njihovo rast in razmnoževanje in ugotovili katera je najprimernejša začetna koncentracija celic za naš poskus. Podobno smo želeli pokazati s hrustančnimi celicami, vendar je zaradi pritrjenosti in tripsinizacije prihajalo do velikih odstopanj, zato grafi niso prikazani.



Celice Jurkat smo nasadili v dveh različnih začetnih koncentracijah ter 4 dni spremljali spreminjanje viabilnosti celic s testom XTT in s štetjem s tripsanskim modrilom ter rezultate primerjali.

**Legenda:** ■ - začetna koncentracija celic v času 0h za standardni način štetja je  $1 \times 10^4$ , ■ - začetna koncentracija celic v času 0h za test XTT je  $1 \times 10^4$ , ▲ - začetna koncentracija celic v času 0h za standardni način štetja je  $4 \times 10^4$ , ▲ - začetna koncentracija celic v času 0h za test XTT je  $4 \times 10^4$ .

Slika 13: Spreminjanje števila celic Jurkat glede na čas inkubacije.

Na sliki 13 vidimo, da so vrednosti števila živih celic pri testu XTT za 100% ali več višje kot pri standardnem načinu štetja s tripsanskim modrilom. Prav tako lahko opazimo, da je pri testu XTT tretji dan inkubacije število živih celic nepričakovano padlo pri obeh začetnih koncentracijah celic.

#### 4.1.3 Podvojitveni čas

V optimizacijskih poskusih smo želeli ugotoviti kakšen je podvojitveni čas celic. Rezultati so pokazali, da je podvojitveni čas Jurkat celic 1 dan, hrustančnih celic pa 2 dni. Ob upoštevanju tega podatka smo lahko uravnali začetne koncentracije celic tako, da je bilo ob koncu inkubacije, ki je trajala različno dolgo časa, vedno enako število celic.

Preglednica 1: Rezultati optimizacijskega poskusa s katerim smo preverjali podvojevalni čas celic Jurkat.

| čas | žive |     | povprečje | mrtve |    | povprečje | skupaj | št. celic |
|-----|------|-----|-----------|-------|----|-----------|--------|-----------|
| 0h  |      |     |           |       |    |           |        | 200000    |
| 24h | 216  | 206 | 211       | 10    | 15 | 12,5      | 223,5  | 447000    |
| 48h | 350  |     | 350       | 38    |    | 38        | 388    | 776000    |

V preglednici 1 vidimo, da je število celic Jurkat po 24 urah približno 2x večje kot v začetku inkubacije. Prav tako je po 48 urah število celic približno 2x večje kot po 24 urah, kar potrjuje, da je podvojitveni čas celic Jurkat 1 dan. Za hrustančne celice smo na podlagi predhodnih izkušenj z delom v laboratoriju določili, da je podvojitveni čas 2 dni.

S pomočjo navodil proizvajalcev testa XTT in »kita APOPCYTO« ter primerjave med standardnim načinom štetja s pomočjo tripanskega modrila in testom XTT, smo ugotovili, da je najprimernejše končno število celic v 96- lukenjski plošči za test XTT  $2 \times 10^5$  celic na 200  $\mu$ l gojišča, v 6-lukenjski plošči za test določanja kaspazne aktivnosti pa  $5 \times 10^6$  celic v dveh ml gojišča. Glede na te ugotovitve, smo prilagodili začetno število celic za vsak dan inkubacije, tako, da je bilo končno število celic po določenem času inkubacije vedno enako. Preglednica 2 prikazuje koliko celic smo nasadili v posamezno luknjo za določen dan inkubacije.

Preglednica 2: Število celic, ki smo jih nasadili v 6- in 96-lukenjske plošče glede na število dni inkubacije.  
a) Jurkat celice; b) hrustančne celice.

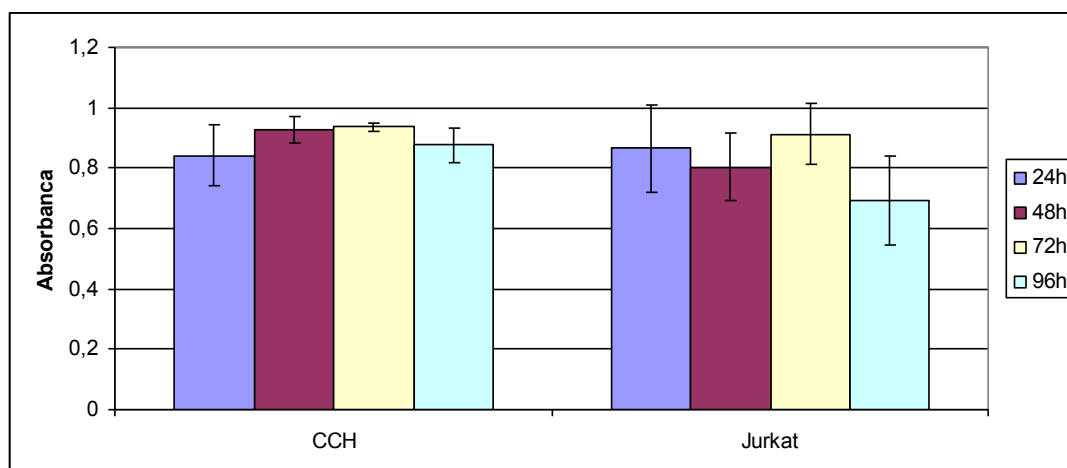
a)

| Jurkat           | 96-lukenjska plošča | 6-lukenjska plošča   |
|------------------|---------------------|----------------------|
| 1 dan inkubacije | $1 \times 10^5$     | $2,5 \times 10^6$    |
| 2 dni inkubacije | $0,5 \times 10^5$   | $1,25 \times 10^6$   |
| 3 dni inkubacije | $0,25 \times 10^5$  | $0,625 \times 10^6$  |
| 4 dni inkubacije | $1,25 \times 10^4$  | $0,3125 \times 10^6$ |

b)

| CCH              | 96-lukenjska plošča | 6-lukenjska plošča |
|------------------|---------------------|--------------------|
| 1 dan inkubacije | $1,5 \times 10^5$   | $3,75 \times 10^6$ |
| 2 dni inkubacije | $1 \times 10^5$     | $2,5 \times 10^6$  |
| 3 dni inkubacije | $0,75 \times 10^5$  | $1,88 \times 10^6$ |
| 4 dni inkubacije | $0,5 \times 10^5$   | $1,25 \times 10^6$ |

Slika 14 potrjuje, da je bil izračun začetnih koncentracij za določen inkubacijski čas v mejah standardnih napak pravilen, saj je ob koncu inkubacije viabilnost celic primerljiva.



Slika 14: Viabilnost hrustančnih celic (CCH) in celic Jurkat ob koncu različno dolgih inkubacijskih časov (test XTT).

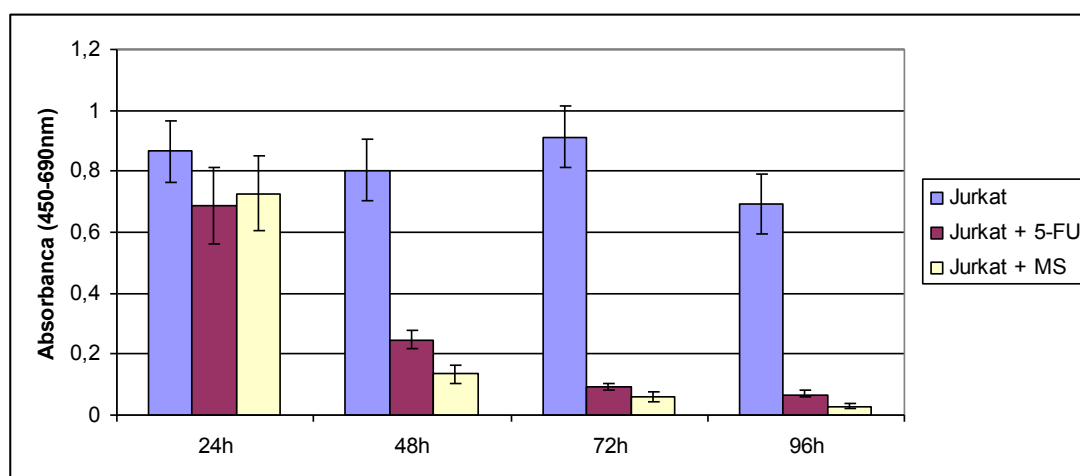
#### 4.2 VPLIV *M. synoviae* NA PREŽIVETJE CELIC

Želeli smo pokazati, kako *M. synoviae* vpliva na preživetje hrustančnih celic.

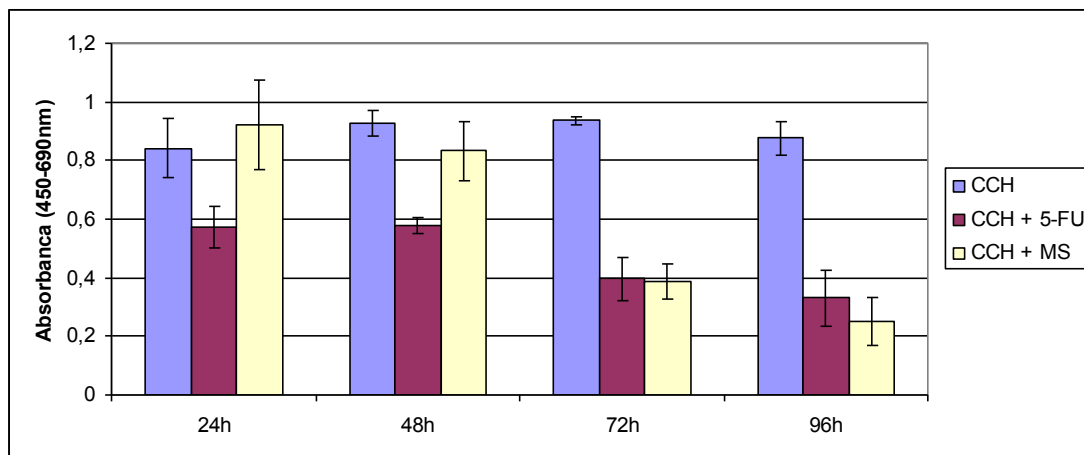
Pri celicah (Jurkat in hrustančnih celicah), okuženih z *M. synoviae* ali 5-FU, viabilnost celic s časom inkubacije pada.

Na sliki 15a lahko vidimo, da pri celicah Jurkat inkubacija s kemoterapevtikom 5-FU ali z bakterijsko kulturo po 24 urah inkubacije ne povzroči velike spremembe viabilnosti celic, vendar pa po 48 urah viabilnost pade za dve tretjini.

a)



b)



Celice Jurkat in hrustančne celice smo nasadili z različnimi začetnimi koncentracijami tako, da je bilo ob koncu inkubacije, ki je trajala od 24h do 96h, vedno enako število celic v negativni kontroli. Viabilnost smo določili s testom XTT.

Legenda:

CCH – Hrustančne celice gojene v optimalnem rastnem mediju (negativna kontrola)

CCH + 5-FU - Hrustančne celice gojene v optimalnem rastnem mediju z dodanim 5-FU

CCH + MS – Hrustančne celice gojene v optimalnem rastnem mediju in okužene z *M. synoviae*

Jurkat – celice Jurkat gojene v optimalnem rastnem mediju (negativna kontrola)

Jurkat + 5-FU - celice Jurkat gojene v optimalnem rastnem mediju z dodanim 5-FU

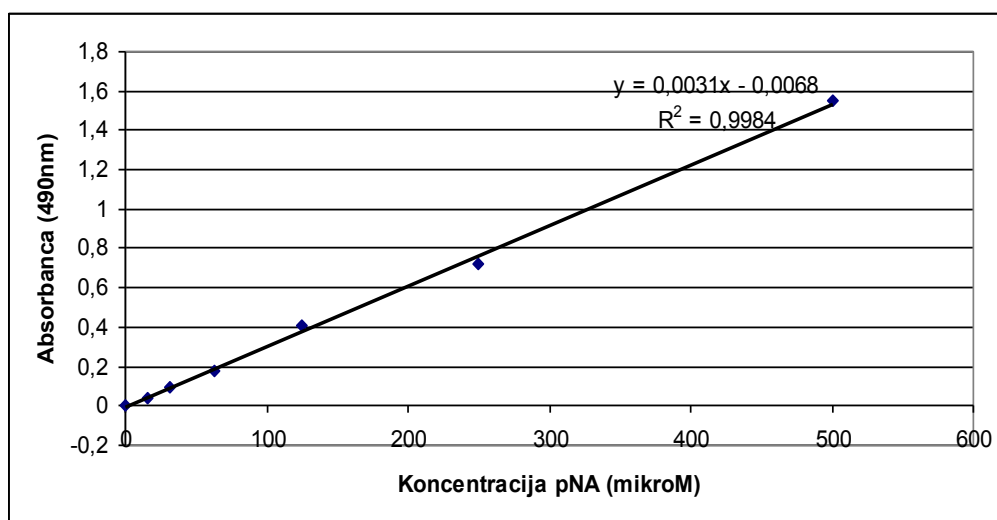
Jurkat + MS - celice Jurkat gojene v optimalnem rastnem mediju in okužene z *M. synoviae*

Slika 15: Vpliv okužbe z bakterijo *Mycoplasma synoviae* na preživetje a) celic Jurkat in b) hrustančnih celic.

Na sliki 15b vidimo, da je vpliv 5-FU na hrustančne celice takojšen, saj število celic že po 24 urah inkubacije drastično pade, kasneje pa se število le počasi zmanjšuje. Okužba hrustančnih celic z *M. synoviae* v prvih 48 urah praktično ne spremeni števila živih celic, po 72 urah pa le-to pade za več kot 50 % in doseže enak nivo kot pri 5-FU. Po 96 urah se število viabilnih celic še zniža, posebno pri okužbi z *M. synoviae*.

#### 4.3 VPLIV *M. synoviae* NA AKTIVNOST KASPAZE-3

Stopnja aktivnosti kaspaze-3 nam pove v kolikšni meri je prisotna programirana celična smrt – apoptoza. Da smo lahko izračunali kolikšna je aktivnost, smo potrebovali umeritveno krivuljo, ki je prikazana na sliki 16. Tako smo lahko iz izmerjene absorbance določili koliko produkta (pNA) je nastalo zaradi aktivnosti kaspaze-3, ki je cepila substrat (DEVD-pNA).

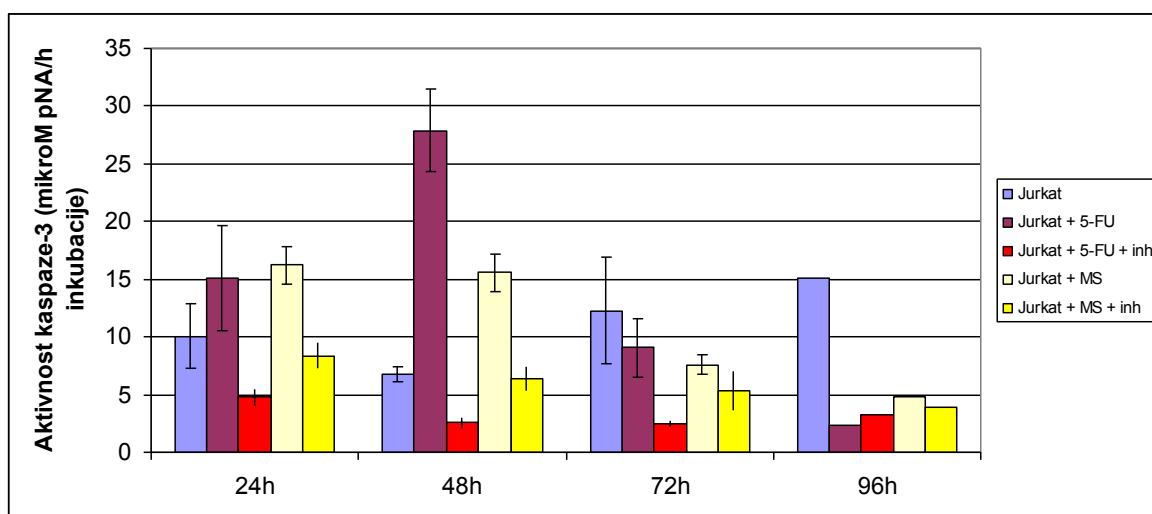


pNA smo pripravili v različnih koncentracijah in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 490 nm.

Slika 16: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije pNA

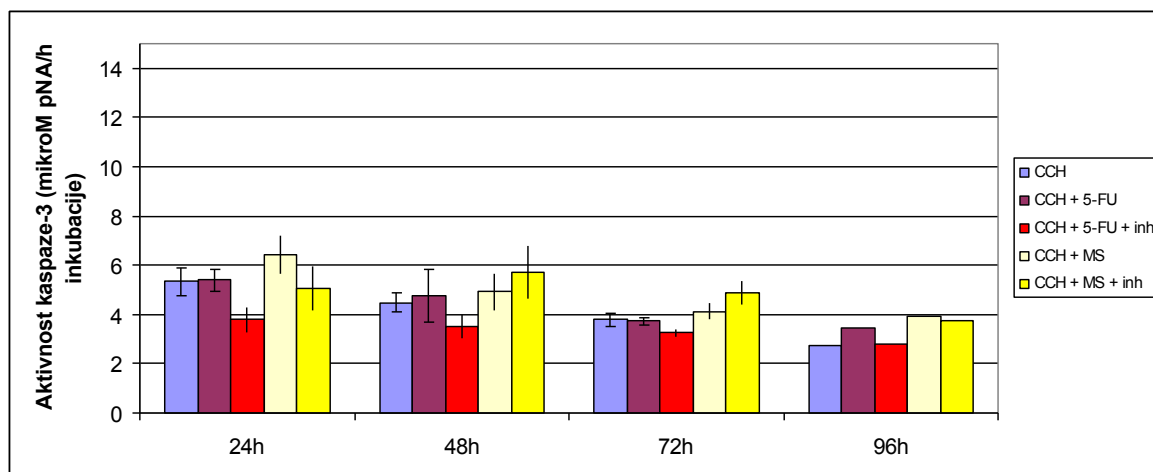
Slika 17a prikazuje stopnjo kaspazne aktivnosti pri različnih vzorcih 24, 48, 72 in 96 ur po okužbi celic Jurkat. Pri negativni kontroli lahko vidimo, da kaspazna aktivnost drugi dan inkubacije pade, nato pa narašča in doseže najvišjo vrednost pri 96 urah. V nasprotju z negativno kontrolo so rezultati pri vzorcu z dodanim 5-FU. Tukaj lahko opazimo, da je kaspazna aktivnost drugi dan inkubacije najvišja in potem s časom pada. Podoben učinek ima tudi okužba z bakterijo *M. synoviae*, vendar se drugi dan inkubacije aktivnost ne poveča, ampak ostane enaka kot po 24 urah inkubacije. Pri vzorcih z dodanim inhibitorjem se aktivnost zmanjša. Najbolj je bila izražena inhibicija kaspaze-3, če so bile celice Jurkat inkubirane s 5-FU 48 ur in je bil vzorcu dodan inhibitor kaspaze-3.

a)





b)



Liziranim celicam smo dodali substrat (peptidil-pNA) za kaspazo-3 in nekaterim tudi inhibitor kaspaze-3 in po dveurni inkubaciji izmerili absorbanco pri valovni dolžini 405 nm. Za čas inkubacije 96h zaradi okužbe nismo mogli izrisati standardnih odklonov.

Legenda:

Jurkat – negativna kontrola: celice Jurkat gojene v optimalnem rastnem mediju

Jurkat + 5-FU – celice Jurkat z dodanim 5-FU

Jurkat + 5-FU + inh – celice Jurkat z dodanim 5-FU in dodatek inhibitorja kaspaze-3

Jurkat + MS – celice Jurkat okužene z *M. synoviae*

Jurkat + MS + inh – celice Jurkat okužene z *M. synoviae* in dodatek inhibitorja kaspaze-3

CCH – negativna kontrola: hrustančne celice gojene v optimalnem rastnem mediju

CCH + 5-FU – hrustančne celice z dodanim 5-FU

CCH + 5-FU + inh – hrustančne celice z dodanim 5-FU in dodatek inhibitorja kaspaze-3

CCH + MS – hrustančne celice okužene z *M. synoviae*

CCH + MS + inh – hrustančne celice okužene z *M. synoviae* in dodatek inhibitorja kaspaze-3

Slika 17: Aktivnosti kaspaze-3 v: a) celicah Jurkat in b) hrustančnih celicah glede na čas inkubacije.

Na sliki 17 lahko vidimo, da je stopnja aktivnosti kaspaze-3 v hrustančnih celicah, v primerjavi s kaspazno aktivnostjo pri celicah Jurkat, pri vseh vzorcih nižja. V celicah okuženih z bakterijo *M. synoviae* je le malo višja kot pri negativni kontroli, pri vzorcih z dodanim 5-FU pa je skoraj enaka. V nasprotju z našimi pričakovanji dodatek inhibitorja kaspaze-3 ni vplival na zmanjšanje kaspazne aktivnosti, ampak je v primeru okužbe z bakterijo *M. synoviae* le-ta višja.

Z določanjem celokupnih proteinov smo preverjali ali so med posameznimi vzorci morda razlike v količini proteinov. Ugotovili smo, da je količina proteinov primerljiva. Natančnega števila celic v vsakem od vzorcev namreč ne moremo zagotoviti, zato je bil to dodaten podatek, da so si vzorci enaki in da so nastale razlike v meritvah kaspazne aktivnosti res le na račun delovanja encima ne pa na račun razlik med vzorci.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Bakterija *Mycoplasma synoviae* pri perutnini, poleg bolezni dihal povzroča tudi vnetja sklepov, kar imenujemo infekciozni sinovitis. Ločimo akutno fazo, za katero so značilni otekli sklepi, vnetje sinovialne membrane in tetive, povečana količina sinovialne tekočine, anemija in kronično fazo, kjer se poškodujejo tkiva v sklepu, stanjša se hrustanec in nastanejo tudi erozije. Verjetno pri tem umirajo tudi hrustančne celice, ne ve pa se, kakšna oblika celične smrti je prisotna (Kerr in Olson, 1970).

V nalogi smo želeli raziskati kakšen vpliv ima bakterija *M. synoviae* na preživetje kokošjih hrustančnih celic v pogojih *in vitro*. Želeli smo preveriti kakšna je sprememba viabilnosti celic in ali je ta sprememba posledica programirane celične smrti - apoptoze.

Kot pozitivno kontrolo smo uporabili celice Jurkat, celično linijo, ki izhaja iz človeških levkemičnih limfocitov T. Na svoji površini imajo izraženih več receptorjev, ki sodelujejo pri celični smrti, zato so dober in v raziskavah pogosto uporabljen model za preučevanje apoptoze. Za indukcijo apoptoze pri celicah Jurkat smo uporabili kemoterapevtik 5-fluorouracil (5-FU), saj je znano, da v določenih vrstah celic (tudi Jurkat) poveča izražanje Fas receptorja in posledično tudi kaspaze-3 in PARP proteina, ki so pomembni izvrševalci apoptoze. Okužba celic s 5-FU je bila referenca s katero smo primerjali rezultate okužbe z bakterijo *M. synoviae* (Eichhorst in sod. 2001).

#### 5.1.1 Optimizacijski poskusi

Preden smo začeli s poskusom, smo morali optimizirati eksperimentalne pogoje. Večino optimizacijskih poskusov smo naredili s celicami Jurkat, saj smo jih prvič uporabili v laboratoriju in nismo imeli nobenih izkušenj z delom z njimi. Ker smo za določitev viabilnosti celic uporabljali test XTT, ki je spektrofotometrična metoda in je hitrejša ter manj subjektivna metoda kot standardni način štetja celic s pomočjo tripsanskega modrila, smo ti dve metodi najprej primerjali. Pred tem smo poiskali umeritveno območje, ki je primerno za določanje viabilnosti s testom XTT in kjer so rezultati zanesljivi, da smo lahko začeli s primerjavo med testi.

S primerjavo obeh načinov štetja smo ugotovili, da s testom XTT ne moremo izraziti števila celic, saj na višino izmerjene absorbance vzorca vpliva predvsem respiratorna aktivnost živih celic, ki pa je od celice do celice različna in tako dobimo s tem testom tudi do 5x višje vrednosti kot pri standardnem načinu štetja. Prav tako nam izražanje rezultatov v številu živih celic onemogočajo omejitve testa: ko koncentracija celic preseže določeno

vrednost, se izmerjena absorbanca, kljub povečevanju števila celic ne spreminja (slika 12). Podobno je v primeru enakih koncentracij celic, kjer meritve kažejo različno vrednost absorbance, kar nam govori o različnih respiratornih aktivnostih živih celic. Na sliki 13 opazimo, da tretji dan inkubacije pri meritvah s testom XTT, viabilnost celic Jurkat pade, kar obrazložimo z neprimernim umeritvenim območjem, ki je prisotno in v katerem rezultati niso zanesljivi.

Pred začetkom poskusa smo želeli vedeti kakšen je podvojitveni čas celic Jurkat in hrustančnih celic. S standardnim načinom štetja smo ugotovili, da je podvojitveni čas celic Jurkat 1 dan (preglednica 1). Za hrustančne celice smo iz predhodnih izkušenj vedeli, da se njihovo število podvoji v dveh dneh. Ob upoštevanju tega podatka smo uravnali začetne koncentracije celic tako, da je bilo ob koncu inkubacije, ki je trajala različno dolgo časa, vedno enako število celic. S testom XTT smo pokazali (slika 14), da so bili naši izračuni začetnih koncentracij za določen inkubacijski čas v mejah standardnih napak pravilen, saj je ob koncu inkubacije viabilnost celic primerljiva.

Pri optimizaciji eksperimentalnih pogojev smo tudi ugotavljali, kakšna je najboljša začetna koncentracija celic, ki jih bomo nasadili, da izločimo čim več stranskih vplivov na rezultat. Pri primerjavi med obema načinoma štetja smo ugotovili, da za test XTT ne smemo prekoračiti določene koncentracije celic v eni luknji, saj se absorbanca kljub povečevanju števila celic ne spreminja. Zato mora biti začetna koncentracija primerna, da bo ob koncu vsakega dneva inkubacije koncentracija celic v eni luknji enaka ali manjša od najvišje dovoljene.

Tudi za test določanja aktivnosti kaspaze-3 smo morali ugotoviti primerno koncentracijo celic v eni luknji. Navodila proizvajalca »APOPCYTO kita« so za en vzorec zahtevala določeno število celic, mi pa smo morali te celice inkubirati v primernem volumnu medija, da:

- so tudi po štiridnevni inkubaciji imele dovolj hranil za rast in razmnoževanje
- smo preprečili, da pomanjkanje hranil v mediju vpliva na zmanjšanje števila celic.

Ta dva kriterija smo upoštevali tudi pri nasaditvi celic na 96-lukenjske plošče za test XTT.

Ko smo dobili rezultate optimizacije eksperimentalnih pogojev, smo začeli z našimi raziskavami.

### 5.1.2 Vpliv *M. synoviae* na preživetje celic

S testom XTT smo želeli pokazati kako vpliva bakterija *M. synoviae* na preživetje kokošjih hrustančnih celic. Pričakovali smo, da se s časom inkubacije število živih celic zmanjšuje, zaradi prisotnosti *M. synoviae*, kar smo tudi dokazali.

Za spremljanje viabilnosti okuženih celic, smo najprej naredili negativno kontrolo; celice gojene v optimalnem rastnem mediju. S tem smo želeli videti ali na spremembo viabilnosti vpliva tudi kakšen zunanji dejavnik, ki ga nismo predvideli. Slika 14 potrjuje, da so bili optimizacijski poskusi dobro narejeni, saj je v negativni kontroli obeh vrst celic ob koncu različno dolgih inkubacijskih časov, z različnimi začetnimi koncentracijami, viabilnost celic primerljiva. Nastane pa vprašanje ali so vrednosti, ki niso v predhodno določenem umeritvenem območju, dovolj zanesljive. Glede na primerljivost med posameznimi inkubacijskimi časi, sklepamo, da lahko zaupamo tem rezultatom.

Za določitev vpliva *M. synoviae* na preživetje kokošjih hrustančnih celic smo potrebovali referenco z znanim učinkom na celice v smislu indukcije apoptoze, glede na katero smo lahko primerjali učinke bakterije. To je bil kemoterapevtik 5-fluorouracil (5-FU), za katerega vemo, da pri celicah Jurkat povzroča apoptozo in s tem zmanjšano viabilnost (Eichhorst in sod. 2001). Ta preparat je deloval, saj se je pri obeh vrstah celic zmanjšala viabilnost in je povzročila celično smrt. Razlika je bila v dinamiki padanja viabilnosti.

Pri celicah Jurkat je 5-FU že po 24 urah povzročil zmanjšanje viabilnosti celic, po 48 urah pa je viabilnost padla na 30 % glede na negativno kontrolo. V času 72 in 96 ur je viabilnost bila skoraj enaka in le 10 % začetne, kar kaže, da 5-FU povzroči smrt praktično vseh celic Jurkat in ima zelo hiter učinek.

Dinamika spremembe viabilnosti pri hrustančnih celicah z dodanim 5-FU je bila malo drugačna kot pri celicah Jurkat. Tukaj je bila po 24 urah viabilnost manjša v primerjavi s celicami Jurkat, vendar po 48 urah ostaja praktično enaka. To pomeni, da se sicer celice še razmnožujejo, saj je bila začetna koncentracija celic za 48 ur inkubacije manjša kot za 24 ur, vendar pa v tem času 5-FU ni imel vpliva na viabilnost hrustančnih celic. Ponoven upad viabilnosti, za 30 %, smo lahko zasledili po 72 urah inkubacije in tudi malo po 96 urah. Sklepamo lahko, da hrustančne celice niso tako dovzetne za delovanje kemoterapevtika kot celice Jurkat.

Nismo vedeli kakšen učinek bo imela okužba z *M. synoviae* na celice Jurkat, saj je specifičen patogen za perutnino, celice Jurkat pa so celična linija, ki izhajajo iz človeških levkemičnih limfocitov T. Pri teh celicah ima *M. synoviae* skoraj enak vpliv kot 5-FU. Ob

koncu 96 urne inkubacije je bila viabilnost celic Jurkat minimalna. Vprašanje je ali lahko vpliv te bakterije na celice, ki niso perutninskega izvora, razložimo s pripenjanjem patogena na celice preko prisotnosti podobnih receptorjev s sialično kislino na celici ali pa je vzrok napaka pri eksperimentalnem delu.

Tudi na hrustančne celice ima bakterija *M. synoviae* podoben vpliv na preživetje celic kot 5-FU. Razlika je le v inkubacijskih časih 24 in 48 ur. Med tem časovnim obdobjem, se viabilnost drastično ne spremeni, vendar pa je v povprečju za 50 % višja viabilnost celic kot pri celicah z dodanim 5-FU. To pomeni, da po 48 urah bakterija *M. synoviae* ne povzroča smrti hrustančnih celic, ampak šele po 72 urah. Ta rezultat se ujema z dejstvom, da mikoplazme za preživetje potrebujejo gostitelja (Rottem, 2003), zato ga ne smejo uničiti.

Vprašanje je, zakaj je vpliv okužbe (z MS in 5-FU) na celice Jurkat hitrejši in bolj zmanjša viabilnost celic ob koncu štiridnevne inkubacije kot pri hrustančnih celicah. Ali je možno, da na to ne vpliva mehanizem delovanja okužbe (MS in 5-FU) na celice. Ali je lahko takšna razlika v primerjavi s hrustančnimi celicami zato, ker so celice Jurkat suspenzijska kultura, medtem ko so hrustančne celice pritrjena kultura in je dostop *M. Synoviae* oz kemoterapevtika do celic tako različna?

### **5.1.3 Vpliv *M. synoviae* na aktivnost kaspaze-3**

Namen naše naloge je bil tudi ugotoviti, če je zmanjšana viabilnost celic, zaradi okužbe z *M. synoviae*, posledica programirane celične smrti ali se pri tem aktivira katera druga oblika celične smrti. To smo ugotavljali s pomočjo »APOPCYTO kita«, s katerim smo določali stopnjo aktivnosti kaspaze-3, ki je efektorska kaspaza, skupna vsem oblikam signalnih poti, ki vodijo v apoptozo. Zaradi tega, je primerno določiti aktivnost prav te kaspaze.

Slika 17 prikazuje vrednosti kaspazne aktivnosti. Vidimo lahko, da je pri negativni kontroli po 24 urni inkubaciji, pri obeh vrstah celic, prisotna kaspazna aktivnost, ki je nismo pričakovali. Iz tega sklepamo, da imajo zdrave žive celice brez okužbe vedno neko določeno kaspazno aktivnost, kar pomeni, da je v celicah vedno predispozicija, da pride do apoptoze. To je verjetno, saj je apoptoza pomembna komponenta pri razvoju in vzdrževanju večceličnih organizmov, homeostazi in diferenciaciji celic in telesnih organov (Gewies, 2003). Ker pa je pri hrustančnih celicah v začetku kaspazna aktivnost manjša kot pri celicah Jurkat, sklepamo, da so te celice bolj obstojne in se počasneje obnavljajo. V skladu s to trditvijo je tudi dejstvo, da je podvojitveni čas celic Jurkat 1 dan, hrustančne celice pa se podvojijo v dveh dneh.

Pomembno je poudariti, da je kaspaza-3 proteazni encim, ki je podvržen okoljskim vplivom in se zato ob prisotnosti proteaz hitro razgradi in izgubi svojo aktivnost (Dash, 2005). Mi smo aktivnost kaspaze-3 določili tako, da smo spektrofotometrično določili količino produkta (pNA), ki je nastal zaradi delovanja kaspaze-3, ki je cepila substrat DEVD-pNA. Več kot je bilo aktivne kaspaze-3, več pNA je nastalo. S pomočjo umeritvene krivulje (slika 16) smo določili količino nastalega produkta in izračunali stopnjo aktivnosti kaspaze-3 ob koncu štirih inkubacijskih časov.

Da smo preverili pravilnost delovanja testa, s katerim smo določali kaspazno aktivnost, smo pri izvedbi testa nekaterim vzorcem poleg substrata, ki ga cepi kaspaza-3, dodali tudi inhibitor kaspaze. Če je kaspazna aktivnost ob prisotnosti inhibitorja manjša kot brez njega, test dobro deluje. V našem primeru, se je kaspazna aktivnost zmanjšala, opazimo pa lahko (slika 17), da se pri obeh vrstah celic zmanjša le do določene stopnje.

Na sliki 17 lahko vidimo, da je aktivnost kaspaze-3 pri hrustančnih celicah pri vseh vzorcih v povprečju manjša, kot pri celicah Jurkat. To je povezano s spremembo viabilnosti, ki smo jo določili, saj so celice Jurkat hitreje umirale kot hrustančne celice in imajo v skladu s tem tudi večjo kaspazno aktivnost.

Pri celicah Jurkat z dodanim 5-FU je kaspazna aktivnost v skladu s spremembo viabilnosti celic. Po 48 urni inkubaciji je aktivnost kaspaze-3 največja, viabilnost pa se je pri tem inkubacijskem času najhitreje zmanjšala. Kaspazna aktivnost je po 72 in 96 urah vedno nižja, saj se kaspaza-3 razgrajuje, apoptoza pa ni prisotna v taki meri, da bi se induciral nastanek novih molekul kaspaze-3. Tudi viabilnost celic se v tem času ne spremeni tako drastično kot v času med 24 in 48 ur po dodatku 5-FU, zato je količina novonastale kaspaze primerno manjša.

Čeprav je dinamika spreminjanja viabilnosti celic Jurkat okuženih z bakterijo *M. synoviae* podobna kot pri celicah z dodanim 5-FU, dinamika kaspazne aktivnosti ni tako očitna. Sklepamo, da prisotnost bakterije v celicah Jurkat ne povzroča samo apoptoze celic, ampak je v manjši meri prisotna tudi katera druga oblika celične smrti.

Pri hrustančnih celicah je dinamika aktivnosti kaspaze-3 drugačna. Na sliki 17b lahko vidimo, da je kaspazna aktivnost v povprečju manjša kot pri celicah Jurkat, in da se v celicah z dodanim 5-FU ali bakterijo *M. synoviae*, v primerjavi z negativno kontrolo, le-ta ne spremeni tako očitno kot je očitna celična smrt. Iz tega lahko sklepamo, da se pri hrustančnih celicah, ob prisotnosti 5-FU ali bakterije *M. synoviae* ne sproži apoptoza, ampak je za spremembo viabilnosti odgovorna druga oblika celične smrti.

## 5.2 SKLEPI

- Podvojitveni čas celic Jurkat je 1 dan, hrustančnih celic pa 2 dni.
- Izbira kemoterapevtika 5-FU kot reference, je bila dobra, saj se je pri obeh vrstah celic zmanjšala viabilnost in je prišlo do celične smrti.
- Bakterija *M. synoviae* povzroči odmiranje hrustančnih celic po 72 urah, medtem ko je po 48 urah še večina hrustančnih celic živa.
- V populaciji zdravih živih celic, brez okužbe, je prisotna določena kaspazna aktivnost, kar kaže na to, da je v celicah vedno predispozicija, da pride do apoptoze.
- Stopnja aktivnosti kaspaze-3 je pri hrustančnih celicah, okuženih z bakterijo *M. synoviae*, pri vseh inkubacijskih časih nepričakovano nizka, še najvišja je ob koncu 48 urne inkubacije.
- Pri hrustančnih celicah se ob prisotnosti bakterije *M. synoviae* ne sproži očitna apoptoza, ampak je za spremembo viabilnosti verjetno odgovorna druga oblika celične smrti.

## 6 POVZETEK

Bakterija *Mycoplasma synoviae* pri kokoših in puranih najpogosteje povzroča okužbo zgornje dihalne poti, vendar navadno ni izraženih kliničnih znakov. V napredovanju bolezni včasih pride tudi do okužbe spodnjega dihalnega trakta, vnetja zračnih vreč in pri nekaterih pogojih tudi do infekciозnega sinovitisa, ki ima dve fazi: akutno in kronično. Značilnosti akutne faze so otekli sklepi, vnetje sinovialne membrane in tetive, povečana količina sinovialne tekočine, anemija. Te spremembe se pojavijo po 1-3 tednih po okužbi. Po akutni fazi nastopi kronična faza. Za njo je značilna tanjša plast hrustanca, kjer pa nastanejo tudi erozije. Očitne spremembe so vidne po 7-8 tednih po okužbi.

*M. synoviae* v telo vstopa preko dihal, od koder se lahko prenese v druge dele telesa, lahko pa vdre tudi v gostiteljeve celice. Pomemben korak pri uspešni kolonizaciji in patogenezi mikoplazem je njihova sposobnost, da se primejo na površino epitelnih celic. Adherentnost je glavni virulentni faktor mikoplazem, saj so sevi, ki se niso sposobni pritrčiti, manj virulentni. Kljub domnevam, da mikoplazme ostanejo pritrjene na površini epitelnih celic, nedavne študije kažejo, da imajo nekatere vrste mikoplazem razvit mehanizem za vstop v gostiteljeve nefagocitirajoče celice in lahko znotraj njih preživijo. To jim omogoča raznašanje po telesu, izmikanje imunskemu sistemu, hkrati pa verjetno povzroča tudi propad celic, v katere vstopa. *M. synoviae* so našli tudi v vnetih sklepih in dokazali, da v pogojih *in vitro* lahko invadira v hrustančne celice (Dušanić in sod., 2007).

V nalogi smo raziskali, kako vpliva okužba hrustančnih celic z bakterijo *M. synoviae*, v pogojih *in vitro*, na spremembo viabilnosti celic. S testom XTT, ki je spektrofotometrična metoda, smo izmerili absorbanco vzorcev, ta pa je premosorazmerna z viabilnostjo celic. Ugotovili smo, da bakterija *M. synoviae* po 48 urah še ne vpliva na preživetje hrustančnih celic, saj prisotnost bakterije povzroči upad viabilnosti šele po 72 urah.

Namen naloge je bil tudi ugotoviti ali je sprememba viabilnosti posledica programirane celične smrti ali je za to odgovorna katera druga oblika smrti. S pomočjo testa določanja aktivnosti kaspaze-3, ki je efektorska kaspaza, skupna vsem oblikam signalnih poti, ki vodijo v apoptozo, smo ugotovili, da imajo zdrave žive celice vedno neko določeno kaspazno aktivnost, kar pomeni, da je v celicah vedno predispozicija, da pride do apoptoze. Kaspazna aktivnost je pri vseh vzorcih hrustančnih celic nepričakovano nizka, vendar je po 48 urni inkubaciji najvišja. Sklepamo, da se pri hrustančnih celicah, ob prisotnosti bakterije *M. synoviae* ne sproži apoptoza, ampak je za spremembo viabilnosti odgovorna druga oblika celične smrti.



## 7 VIRI

- Backus H.H.J., Dukers D.F., van Groeningen C.J., Vos W., Bloemena E., Wouters D., van Riel J.M.G.H., Smid K., Giaccone G., Pinedo H.M., Peters G.J. 2001. 5-Fluorouracil induced Fas upregulation associated with apoptosis in livermetastases of colorectal cancer patients. *Annals of Oncology*, 12: 209-216
- Baroli B. 2008. Designing hydrogel-based grafts. V: International Summer School on Advanced Biomedical Technologies for Treatment of Osteochondral Defects, Piran, 14-21 sept. 2008 (neobjavljeno)
- Benčina D. 2002. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathology*, 31: 535-547
- Berčič R.L., Slavec B., Lavrič M., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2008. A survey of avian *Mycoplasma* species for neuraminidase enzymatic activity. *Veterinary Microbiology*, 130: 391-397
- Bhosale A.M., Richardson J.B. 2008. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin*, 87: 77-95
- Boatright K.M. in Salvesen G.S. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15: 725-731
- Burgering B.M.T., Kops G.J.P.L. 2002. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27, 7: 352-360
- Bursch W., Karwan A., Mayer M., Dornetshuber J., Fröhwein U., Schulte-Hermann R., Fazi B., Di Sano F., Piredda L., Piacentini M., Petrovski G., Fésüs L., Gerner C. 2008. Cell death and autophagy: Cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology*, 254: 147-157
- Cuervo A.M. 2004. Autophagy: Many paths to the same end. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263: 55-72
- Dash P. 2005. Apoptosis. Basic Medical Sciences. St.George's, University of London.  
<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/apoptosis.pdf> (15. apr. 2010)
- Del Carlo M., Loeser R.F. 2010. Cell death in osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports*, 10: 37-42
- Dufour-Gesbert F., Dheilly A., Marois C., Kempf I. 2006. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Veterinary Microbiology*, 114: 148-154
- Dušanić D., Berčič R.L., Cizelj I., Salmič S., Narat M., Benčina D. 2009. *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells in vitro. *Veterinary Microbiology*, 138: 114-119

Dušanić D., Bolha L., Oven I., Benčina D., Narat M. 2009. *Mycoplasma* species *M. synoviae*, *M. canis*, *M. cynos* and *M. agalactiae* possess membrane-associated nucleases. V: Skupni kongres Otočec 2009, Otočec, 20-23 sept. 2009 (poster)

Edinger A.L., Thompson C.B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16: 663–669

Eichhorst S.T., Muerköster S., Weigand M.A., and Krammer P.H. 2001. The Chemotherapeutic Drug 5-Fluorouracil Induces Apoptosis in Mouse Thymocytes *in Vivo* via Activation of the CD95(APO-1/Fas) System. *Cancer Research*, 61: 243–248

Esclatine A., Chaumorce M., Codogno P. 2009. Macroautophagy Signaling and Regulation. *Autophagy in Infection and Immunity, Current Topics in Microbiology and Immunology*, 335: 33-70

Festjens N., Berghe T.V., Vandenabeele P. 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757: 1371–1387

Gewies A. 2003. Introduction to Apoptosis. CellDeath.de.  
<http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm#fig6> (19. apr. 2010)

Golstein P., Kroemer G. 2006. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 32, 1: 37-47

Hollister S.J. 2005. Cartilage structure and function. Ann Arbor, College of Engineering, University of Michigan (8. jun. 2010)

Hotchkiss R.S., Strasser A., McDunn J.E., Swanson P.E. 2009. Mechanisms of disease Cell death. *The New England Journal of Medicine*, 361: 1570-83

Jordan F.T. 1985. Gordon Memorial Lecture: people, poultry and pathogenic mycoplasmas. *British Poultry Science*, 26: 1-15

Kawakubo Y., Kume K., Yoshioka M. 1981. Effects of thymectomy and bursectomy on the systemic lesions of experimental *Mycoplasma synoviae* infection. *Journal of Comparative Pathology*, 91: 143-151

Kawakubo Y., Kume K., Yoshioka M., Nishiyama Y. 1980. Histo- and immuno-pathological studies on experimental *Mycoplasma synoviae* infection of the chicken. *Journal of Comparative Pathology*, 90: 457-467

Kerr K.M., Olson N.O. 1970. Pathology of chickens inoculated experimentally or contact-infected with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 14: 291-320

- Kerr K.M., Olson N.O. 1970. A comparison of radiographic lesions in pelvic limbs of chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, or an arthritis-producing virus. *Avian Diseases*, 14: 654-64
- Kleven S.H., Yoder H.W. 1989. Mycoplasmosis. V: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Purchase H.G., Arp L.H., Domermuth C.H., Pearson J. E. (eds.). Dubuque, Iowa, American Association of Avian Pathologists: 57-62
- Knecht E., Salvador N. 2005. Chaperone-Mediated Autophagy. V: Lysosomes. Saftig P. (ed.). Valencia, Eureka.com, Springer Science + Business Media: 181-193
- Kohn D.F., Magill L.S., Chinookoswong N. 1982. Localization of *Mycoplasma pulmonis* in Cartilage. *Infection and Immunity*, 35: 730-733
- Kohn D.F., Chinookoswong N. 1989. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in Arthritic Joints of Rats by Indirect Immunoperoxidase Staining. *Infection and Immunity*, 57: 1321-1323
- Kregar V.N., Barlič A., Drobnič M., Radosavljevič D. 2008. Autologous cell therapies for cartilage tissue regeneration. V: International Summer School on Advanced Biomedical Technologies for Treatment of Osteochondral Defects, Piran, 14-21 sept. 2008 (neobjavljeno)
- Kroemer G., El-Deiry W.S., Golstein P., Peter M.E., Vaux D., Vandenabeele P., Zhivotovsky B., Blagosklonny M.V., Malorni V., Knight R.A., Piacentini M., Nagata S., Melino G. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 12: 1463-1467
- Kume K., Kawakubo Y., Morita C., Hayatsu E., Yoshioka M. 1977. Experimentally induced synovitis of chickens with *Mycoplasma synoviae*: effects of Bursectomy and Thymectomy on course of the infection for the first four weeks. *American Journal of Veterinary Research*, 38: 1595-1600
- Lin Z., Willer C., Xu J., Zheng M.-H. 2006. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Engineering*, 12, 7: 1971-1984
- Lockaby S.B., Hoerr F.J., Lauerman L.H., Kleven S.H. 1998. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in Broiler Chickens. *Veterinary Pathology*, 35: 178-190
- Morrow C.J., Bell I.G., Walker S.B., Markham P.F., Thorp B.H., Whithear K.G. 1990. Isolation of *Mycoplasma synoviae* from infectious synovitis of chickens. *Australian Veterinary Journal*, 67, 4: 121-124
- Lockaby S.B., Hoerr F.J. 1999. Virulence of *Mycoplasma synoviae* in poultry: a review. *World's Poultry Science Journal*, 55: 175-185

- Lockaby S.B., Hoerr F.J., Lauerman L.H., Kleven S.H. 1998. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in Broiler Chickens. *Veterinary Pathology*, 35: 178-190
- Logunov D.Y., Scheblyakov D.V., Zubkova O.V., Shmarov M.M., Rakovskaya I.V., Gurova K.V., Tararova N.D., Burdelya L.G., Naroditsky B.S., Ginzburg A.L., Gudkov A.V. 2008. Mycoplasma infection suppresses p53 activates NF- $\kappa$ B and cooperates with oncogenic Ras in rodent fibroblast transformation. *Oncogene*, 27: 4521-4531
- Marlovits S. 2008. Autologous Chondrocyte Cartilage Repair. V: *Orthopedic Biology and Medicine: Musculoskeletal Tissue Regeneration, Biological Materials and Methods*. Pietrzak W.S. (ed.). Totowa, Humana Press: 369-394
- Marois C., Picault J-P., Kobisch M., Kempf I. 2005. Experimental evidence of indirect transmission of *Mycoplasma synoviae*. *Veterinary Research*, 36: 759-769
- Morrow C.J., Bell I.G., Walker S.B., Markham P.F., Thorp B.H., Whithear K.G. 1990. Isolation of *Mycoplasma synoviae* from infectious synovitis of chickens. *Australian Veterinary Journal*, 67: 121-124
- Narat M. 1997. Predomination of CD8+ lymphocytes in synovial fluid of chickens with experimentally induced infectious synovitis. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo (Zootehnika)*, 70: 127-133
- Narat M., Benčina D., Kleven S.H., Habe F. 1998. The Hemagglutination-Positive Phenotype of *Mycoplasma synoviae* Induces Experimental Infectious Synovitis in Chickens More Frequently than Does the Hemagglutination-Negative Phenotype. *Infection and Immunity*, 66: 6004-6009
- Nicholson D.W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, 6: 1028-1042
- Otero M., Goldring M.B. 2007. Reviews Cells of the synovium in rheumatoid arthritis Chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 9: 220
- Porter A.G., Reiner U.J. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6: 99-104
- Proskuryakov S.Y., Konoplyannikov A.G., Gabai V.L. 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death. *Experimental Cell Research*, 283: 1-16
- Razin D., Yoger D., Naot Y. 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 4: 1094-1156
- Rottem S., Naot Y. 1998. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends in Microbiology*, 6, 11: 436-440
- Rottem S. 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*, 83: 417-432

- Schuerwegh A.J., Dombrecht E.J., Stevens W.J., Van Offel J.F., Kockx M.M., Bridts C.H., De Clerck L.S. 2007. Synovial fluid and peripheral blood immune complexes of patients with rheumatoid arthritis induce apoptosis in cytokine-activated chondrocytes. *Rheumatology International*, 27: 901-909
- Sandell L.J., Aigner T. 2001. Articular cartilage and changes in arthritis, An introduction: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research*, 3: 107–113
- Senties-Cué G., Shivaprasad H.L., Chin R.P. 2005. Systemic *Mycoplasma synoviae* infection in broiler chickens. *Avian Pathology*, 34, 2: 137-142
- Singh A.P. 2007. Structure of a synovial joint. *Bone and Spine*.  
<http://boneandspine.com/joints/structure-synovial-joint/> (7. jun. 2010)
- Zangemeister-Wittke U., Simon H-U. 2001. Apoptosis - Regulation and clinical implications. *Cell Death and Differentiation*, 8: 537-544
- Zhivotovsky B., Orrenius S. 2010. Cell death mechanisms: Cross-talk and role in disease. *Experimental Cell Research*, 316: 1374-1383
- Walker E.R., Friedman M.H., Olson N.O., Sahu S.P., Mengoli H.F. 1978. An Ultrastructural Study of Avian Synovium Infected With An Arthrotropic Mycoplasma, *Mycoplasma synoviae*. *Veterinary Pathology*, 15: 407-416

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mojci Narat za vso pomoč, trud, čas, nasvete in vzpodbude, ki so pripomogli k izdelavi diplomskega dela!

Zahvaljujem se recenzentu, znanstvenemu svetniku dr. Dušanu Benčini za trud, koristne nasvete in pripombe ter hiter pregled diplomske naloge!

Hvala Daliborki Dušanić, ki me je uvedla v laboratorijsko delo. Hvala za ves trud, pomoč, čas, nasvete, potrpežljivost! Hvala za vse, kar smo skupaj doživeli!

Hvala tudi vsem v laboratoriju, ki ste mi kakorkoli pomagali in svetovali!

Hvala staršem, Blažu, Juretu in vsem sorodnikom, ki ste mi stali ob strani, me podpirali, vzpodbujali in mi pomagali!

Hvala vsem prijateljem in znancem, ki ste mi popestrili delovne dni! ☺  
Hvala za vso pomoč in trud!

Hvala vsem in vsakemu posebej, saj mi brez vas ne bi nikoli uspelo priti do sem!!

## PRILOGE

### Priloga A: Optimizacijski poskusi

#### Priloga A1: Primerjava med standardnim načinom štetja s pomočjo barvila tripanškega modrila in testom XTT. Celice Jurkat.

| XTT         | Dnevi inkubacije | 10 <sup>4</sup> * |           |           | 4x10 <sup>4</sup> * |            |            |
|-------------|------------------|-------------------|-----------|-----------|---------------------|------------|------------|
|             |                  | povprečje         |           |           | povprečje           |            |            |
|             | 1. dan           | 68229,17          | 55208,33  | 61718,75  | 158072,92           | 158072,92  | 158072,92  |
|             | 2. dan           | 104687,50         | 108593,75 | 106640,63 | 346875,00           | 310416,67  | 328645,83  |
|             | 3. dan           | 30468,75          | 20052,08  | 25260,42  | 286979,17           | 254427,08  | 270703,13  |
|             | 4. dan           | 270052,08         | 464062,50 | 367057,29 | 1139843,75          | 1004427,08 | 1072135,42 |
| Trypan blue |                  |                   |           |           |                     |            |            |
|             | 1. dan           | 14000             | 15000     | 14500     | 43000               | 53000      | 48000      |
|             | 2. dan           | 18900             | 19800     | 19350     | 99288               | 96300      | 97794      |
|             | 3. dan           | 40080             | 38775     | 39428     | 236359              | 178192     | 207275     |
|             | 4. dan           | 86010             | 80500     | 83255     | 561200              | 528693     | 544947     |

\* začetna koncentracija celic v času 0 h

#### Priloga A2: Podatki za umeritveno območje na sliki 12

| Število celic (x10 <sup>5</sup> ) | Povprečje absorbanc |
|-----------------------------------|---------------------|
| 5                                 | 0,4515              |
| 2,5                               | 0,4405              |
| 1,25                              | 0,427               |
| 0,625                             | 0,2855              |
| 0,3125                            | 0,1735              |
| 0,15625                           | 0,141               |
| 0,078125                          | 0,073               |
| 0                                 | 0,0545              |

**Priloga B:**  
**Rezultati testa XTT. Merjenje absorbance pri času inkubacije a) 24h; b) 48h;**  
**c) 72h d) 96h**

a)

| <b>24h</b>    | 1. pon | 2. pon | 3.pon | 4.pon | 5.pon | 6.pon | 7.pon | 8.pon | arit.sr. <sup>1</sup> | A-odz. <sup>2</sup> | st. odk. <sup>3</sup> | st. nap <sup>4</sup> |
|---------------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| CCH           |        |        | 0,909 | 0,54  | 0,615 | 1,238 | 0,92  | 0,921 | 0,8572                | 0,8423              | 0,251                 | 0,1025               |
| CCH + 5-FU    |        | 0,505  | 0,543 | 0,443 | 0,455 | 0,888 | 0,698 |       | 0,5887                | 0,5738              | 0,173                 | 0,0706               |
| CCH + MS      | 1,621  | 1,871  | 1,669 | 1,664 | 1,174 | 0,763 | 0,763 | 1,268 | 1,3491                | 0,9221              | 0,4263                | 0,1507               |
| jurkat        | 0,434  | 1,065  | 1,095 | 1,322 | 1,532 | 0,566 | 0,397 | 0,63  | 0,8801                | 0,8653              | 0,4138                | 0,1463               |
| jurkat + 5-FU | 0,313  | 0,739  | 1,009 | 0,704 | 1,236 | 0,436 | 0,484 |       | 0,703                 | 0,6882              | 0,3292                | 0,1244               |
| jurkat + MS   | 0,655  | 1,541  | 1,393 | 1,38  | 1,502 | 0,974 | 1,039 | 0,754 | 1,1548                | 0,7278              | 0,3451                | 0,122                |

b)

| <b>48h</b>    | 1. pon | 2. pon | 3.pon | 4.pon | 5.pon | 6.pon | 7.pon | 8.pon | arit.sr. <sup>1</sup> | A-odz. <sup>2</sup> | st. odk. <sup>3</sup> | st. nap <sup>4</sup> |
|---------------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| CCH           |        |        | 0,839 | 0,982 | 1,12  | 0,97  | 0,823 | 0,921 | 0,9425                | 0,9275              | 0,1089                | 0,0445               |
| CCH + 5-FU    | 0,465  |        | 0,592 | 0,556 | 0,57  | 0,63  | 0,697 | 0,646 | 0,5937                | 0,5787              | 0,0745                | 0,0281               |
| CCH + MS      | 1,604  | 0,786  | 1,396 | 1,155 | 1,21  | 0,99  | 1,351 | 1,581 | 1,2591                | 0,8321              | 0,2827                | 0,0999               |
| jurkat        | 0,688  |        | 1,087 | 0,955 | 1,12  |       | 0,597 | 0,466 | 0,8188                | 0,8038              | 0,2728                | 0,1114               |
| jurkat + 5-FU | 0,125  | 0,157  | 0,395 | 0,281 | 0,268 | 0,305 | 0,288 | 0,276 | 0,2619                | 0,2469              | 0,085                 | 0,0301               |
| jurkat + MS   | 0,479  | 0,559  | 0,638 | 0,65  | 0,628 | 0,608 | 0,478 | 0,453 | 0,5616                | 0,1346              | 0,0809                | 0,0286               |

c)

| <b>72h</b>    | 1. pon | 2. pon | 3.pon | 4.pon | 5.pon | 6.pon | 7.pon | 8.pon | arit.sr. <sup>1</sup> | A-odz. <sup>2</sup> | st. odk. <sup>3</sup> | st. nap <sup>4</sup> |
|---------------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| CCH           |        |        | 0,943 | 0,974 | 0,896 | 0,983 | 0,95  | 0,964 | 0,9517                | 0,9365              | 0,031                 | 0,0127               |
| CCH + 5-FU    | 0,168  |        | 0,577 | 0,569 | 0,569 | 0,297 | 0,298 |       | 0,413                 | 0,3978              | 0,1802                | 0,0735               |
| CCH + MS      | 0,671  |        | 0,668 | 0,927 | 0,848 | 1,1   | 0,825 | 0,666 | 0,815                 | 0,388               | 0,163                 | 0,0616               |
| jurkat        | 0,844  |        | 1,202 | 1,155 | 1,065 | 0,645 | 0,661 |       | 0,9287                | 0,9135              | 0,2465                | 0,1006               |
| jurkat + 5-FU | 0,067  | 0,073  | 0,115 | 0,108 | 0,106 | 0,147 | 0,149 |       | 0,1093                | 0,0941              | 0,032                 | 0,0121               |
| jurkat + MS   |        |        | 0,515 | 0,537 | 0,512 | 0,464 | 0,45  | 0,436 | 0,4857                | 0,0587              | 0,041                 | 0,0167               |

d)

| <b>96h</b>    | 1. pon | 2.pon | 3.pon | 4.pon | 5.pon | 6.pon | arit.sr. <sup>1</sup> | A-odz. <sup>2</sup> | st. odk. <sup>3</sup> | st. nap <sup>4</sup> |
|---------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| CCH           | 1,045  | 0,759 | 0,77  | 0,949 | 0,933 |       | 0,8912                | 0,8757              | 0,1234                | 0,0552               |
| CCH + 5-FU    |        | 0,5   | 0,522 | 0,211 | 0,156 |       | 0,3473                | 0,3318              | 0,1906                | 0,0953               |
| CCH + MS      | 0,945  | 0,82  | 0,805 | 0,532 | 0,485 | 0,489 | 0,6793                | 0,2523              | 0,2009                | 0,082                |
| jurkat        | 1,116  | 0,714 |       | 0,459 | 0,542 |       | 0,7078                | 0,6923              | 0,2922                | 0,1461               |
| jurkat + 5-FU | 0,07   | 0,064 |       | 0,096 | 0,095 |       | 0,0813                | 0,0658              | 0,0166                | 0,0083               |
| jurkat + MS   | 0,477  | 0,461 | 0,474 | 0,445 | 0,436 | 0,44  | 0,4555                | 0,0285              | 0,0177                | 0,0072               |

<sup>1</sup> – aritmetična sredina

<sup>2</sup> – minus odzadje -

<sup>3</sup> – standardni odklon vseh ponovitev za 1 vzorec

<sup>4</sup> – standardna napaka vseh ponovitev za 1 vzorec



Priloga C:  
Test določanja stopnje aktivnosti kaspaze-3

Priloga C1:  
Podatki za umeritveno krivuljo na sliki 14

| Koncentracije pNA | ponovitev 1 | ponovitev 2 | ponovitev 3 | ponovitev 4 | povprečje |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|
| 500               | 1,563       | 1,596       | 1,507       | 1,541       | 1,55175   |
| 250               | 0,527       | 0,808       | 0,787       | 0,761       | 0,72075   |
| 125               | 0,417       | 0,422       | 0,397       | 0,386       | 0,4055    |
| 62,5              | 0,16        | 0,15        | 0,204       | 0,195       | 0,17725   |
| 31,25             | 0,103       | 0,101       | 0,104       | 0,077       | 0,09625   |
| 15,625            | 0,032       | 0,036       | 0,067       | 0,022       | 0,03925   |
| 0                 | -0,02       | 0,011       | 0,003       | 0           | -0,0015   |

Priloga C2:  
Rezultati testa določanja stopnje aktivnosti kaspaze-3 za celice Jurkat

| Absorbanca     | Ponovitev 1 | Ponovitev 2 | Ponovitev 3 | Povprečje  | A – odz <sup>1</sup> | μM pNA <sup>2</sup> | aktivnost kas-3<br>(μM pNA/h) <sup>3</sup> |
|----------------|-------------|-------------|-------------|------------|----------------------|---------------------|--------------------------------------------|
| 1.dan neg.     | 0,05        | 0,039       | 0,096       | 0,06166667 | 0,05566667           | 20,1505376          | 10,0752688                                 |
| 1.dan 5-FU     | 0,127       | 0,037       | 0,115       | 0,093      | 0,087                | 30,2580645          | 15,1290323                                 |
| 1.dan 5-FU inh | 0,025       | 0,023       | 0,038       | 0,02866667 | 0,02266667           | 9,50537634          | 4,75268817                                 |
| 1.dan MS       | 0,08        | 0,11        | 0,109       | 0,09966667 | 0,09366667           | 32,4086022          | 16,2043011                                 |
| 1.dan MS inh   | 0,039       | 0,051       | 0,063       | 0,051      | 0,045                | 16,7096774          | 8,35483871                                 |
| 2.dan neg.     | 0,043       | 0,033       | 0,047       | 0,041      | 0,035                | 13,483871           | 6,74193548                                 |
| 2.dan 5-FU     | 0,173       | 0,133       | 0,21        | 0,172      | 0,166                | 55,7419355          | 27,8709677                                 |
| 2.dan 5-FU inh | 0,018       | 0,017       | 0,01        | 0,015      | 0,009                | 5,09677419          | 2,5483871                                  |
| 2.dan MS       | 0,099       | 0,077       | 0,111       | 0,09566667 | 0,08966667           | 31,1182796          | 15,5591398                                 |
| 2.dan MS inh   | 0,037       | 0,028       | 0,051       | 0,03866667 | 0,03266667           | 12,7311828          | 6,3655914                                  |
| 3.dan neg.     | 0,047       | 0,047       | 0,132       | 0,07533333 | 0,06933333           | 24,5591398          | 12,2795699                                 |
| 3.dan 5-FU     | 0,034       | 0,046       | 0,086       | 0,05533333 | 0,04933333           | 18,1075269          | 9,05376344                                 |
| 3.dan 5-FU inh | 0,012       | 0,017       | 0,014       | 0,01433333 | 0,00833333           | 4,88172043          | 2,44086022                                 |
| 3.dan MS       | 0,041       | 0,041       | 0,057       | 0,04633333 | 0,04033333           | 15,2043011          | 7,60215054                                 |
| 3.dan MS inh   | 0,024       | 0,02        | 0,053       | 0,03233333 | 0,02633333           | 10,688172           | 5,34408602                                 |
| 4.dan neg.     |             | 0,048       | 0,138       | 0,093      | 0,087                | 30,2580645          | 15,1290323                                 |
| 4.dan 5-FU     |             | 0,009       | 0,019       | 0,014      | 0,008                | 4,77419355          | 2,38709677                                 |
| 4.dan 5-FU inh |             | 0,027       | 0,012       | 0,0195     | 0,0135               | 6,5483871           | 3,27419355                                 |
| 4.dan MS       |             | 0,022       | 0,036       | 0,029      | 0,023                | 9,61290323          | 4,80645161                                 |
| 4.dan MS inh   |             | 0,029       | 0,018       | 0,0235     | 0,0175               | 7,83870968          | 3,91935484                                 |

<sup>1</sup> – minus odzadje

<sup>2</sup> – izračun količine pNA iz umeritvene krivulje v μM

<sup>3</sup> – aktivnost kaspaze-3 (koliko μM pNA se sprti zaradi delovanja kaspaze-3 na uro inkubacije)

Priloga C3:  
Rezultati testa določanja stopnje aktivnosti kaspaze-3 za hrustančne celice

| Absorbanca     | Ponovitev 1 | Ponovitev 2 | Ponovitev 3 | Povprečje  | A – odz <sup>1</sup> | μM pNA <sup>2</sup> | aktivnost kas-3<br>(μM pNA/h) <sup>3</sup> |
|----------------|-------------|-------------|-------------|------------|----------------------|---------------------|--------------------------------------------|
| 1.dan neg.     | 0,027       | 0,039       | 0,031       | 0,03233333 | 0,02633333           | 10,688172           | 5,34408602                                 |
| 1.dan 5-FU     | 0,027       | 0,036       | 0,035       | 0,03266667 | 0,02666667           | 10,7956989          | 5,39784946                                 |
| 1.dan 5-FU inh | 0,018       | 0,021       | 0,029       | 0,02266667 | 0,01666667           | 7,56989247          | 3,78494624                                 |
| 1.dan MS       | 0,03        | 0,046       | 0,041       | 0,039      | 0,033                | 12,8387097          | 6,41935484                                 |
| 1.dan MS inh   | 0,02        | 0,034       | 0,038       | 0,03066667 | 0,02466667           | 10,1505376          | 5,07526882                                 |
| 2.dan neg.     | 0,025       | 0,024       | 0,032       | 0,027      | 0,021                | 8,96774194          | 4,48387097                                 |
| 2.dan 5-FU     | 0,023       | 0,021       | 0,042       | 0,02866667 | 0,02266667           | 9,50537634          | 4,75268817                                 |
| 2.dan 5-FU inh | 0,027       | 0,017       | 0,019       | 0,021      | 0,015                | 7,03225806          | 3,51612903                                 |
| 2.dan MS       | 0,038       | 0,029       | 0,022       | 0,02966667 | 0,02366667           | 9,82795699          | 4,91397849                                 |
| 2.dan MS inh   | 0,048       | 0,029       | 0,027       | 0,03466667 | 0,02866667           | 11,4408602          | 5,72043011                                 |
| 3.dan neg.     | 0,026       | 0,022       | 0,02        | 0,02266667 | 0,01666667           | 7,56989247          | 3,78494624                                 |
| 3.dan 5-FU     | 0,021       | 0,022       | 0,024       | 0,02233333 | 0,01633333           | 7,46236559          | 3,7311828                                  |
| 3.dan 5-FU inh | 0,018       | 0,021       | 0,019       | 0,01933333 | 0,01333333           | 6,49462366          | 3,24731183                                 |
| 3.dan MS       | 0,028       | 0,025       | 0,021       | 0,02466667 | 0,01866667           | 8,21505376          | 4,10752688                                 |
| 3.dan MS inh   | 0,034       | 0,03        | 0,024       | 0,02933333 | 0,02333333           | 9,72043011          | 4,86021505                                 |
| 4.dan neg.     |             | 0,015       | 0,017       | 0,016      | 0,01                 | 5,41935484          | 2,70967742                                 |
| 4.dan 5-FU     |             | 0,017       | 0,024       | 0,0205     | 0,0145               | 6,87096774          | 3,43548387                                 |
| 4.dan 5-FU inh |             | 0,014       | 0,019       | 0,0165     | 0,0105               | 5,58064516          | 2,79032258                                 |
| 4.dan MS       |             | 0,023       | 0,024       | 0,0235     | 0,0175               | 7,83870968          | 3,91935484                                 |
| 4.dan MS inh   |             | 0,019       | 0,026       | 0,0225     | 0,0165               | 7,51612903          | 3,75806452                                 |

<sup>1</sup> – minus odzadje

<sup>2</sup> – izračun količine pNA iz umeritvene krivulje v μM

<sup>3</sup> – aktivnost kaspaze-3 (koliko μM pNA se sproti zaradi delovanja kaspaze-3 na uro inkubacije)

Priloga D:  
Določanje koncentracije proteinov

Priloga D1:  
Rezultati določanja koncentracije proteinov za celice Jurkat

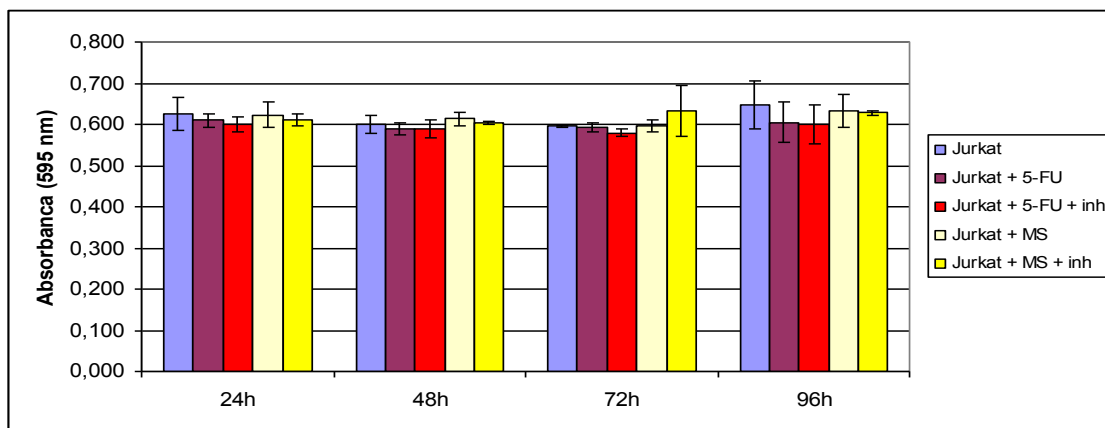
| Vzorci         | Povp 1.pon | Povp 2.pon | Povp 3.pon | Povprečje  |
|----------------|------------|------------|------------|------------|
| 1.dan neg.     | 0,59633333 | 0,57700000 | 0,70233333 | 0,62522222 |
| 1.dan 5-FU     | 0,59866667 | 0,59066667 | 0,64033333 | 0,60988889 |
| 1.dan 5-FU inh | 0,57066667 | 0,59633333 | 0,63366667 | 0,60022222 |
| 1.dan MS       | 0,57633333 | 0,68100000 | 0,60933333 | 0,62222222 |
| 1.dan MS inh   | 0,59666667 | 0,59833333 | 0,63833333 | 0,61111111 |
| 2.dan neg.     | 0,55866667 | 0,62533333 | 0,62000000 | 0,60133333 |
| 2.dan 5-FU     | 0,58566667 | 0,56400000 | 0,61400000 | 0,58788889 |
| 2.dan 5-FU inh | 0,59900000 | 0,54666667 | 0,62233333 | 0,58933333 |
| 2.dan MS       | 0,59566667 | 0,64800000 | 0,59500000 | 0,61288889 |
| 2.dan MS inh   | 0,60666667 | 0,60633333 | 0,59700000 | 0,60333333 |
| 3.dan neg.     | 0,60033333 | 0,59400000 | 0,59200000 | 0,59544444 |
| 3.dan 5-FU     | 0,57533333 | 0,59266667 | 0,60933333 | 0,59244444 |
| 3.dan 5-FU inh | 0,58166667 | 0,56400000 | 0,59433333 | 0,58000000 |
| 3.dan MS       | 0,58500000 | 0,57700000 | 0,62366667 | 0,59522222 |
| 3.dan MS inh   | 0,56200000 | 0,75500000 | 0,58333333 | 0,63344444 |
| 4.dan neg.     |            | 0,70400000 | 0,58966667 | 0,64683333 |
| 4.dan 5-FU     |            | 0,65533333 | 0,55466667 | 0,60500000 |
| 4.dan 5-FU inh |            | 0,64833333 | 0,55166667 | 0,60000000 |
| 4.dan MS       |            | 0,67366667 | 0,59300000 | 0,63333333 |
| 4.dan MS inh   |            | 0,63300000 | 0,62200000 | 0,62750000 |

Priloga D2:  
Rezultati določanja koncentracije proteinov za hrustančne celice

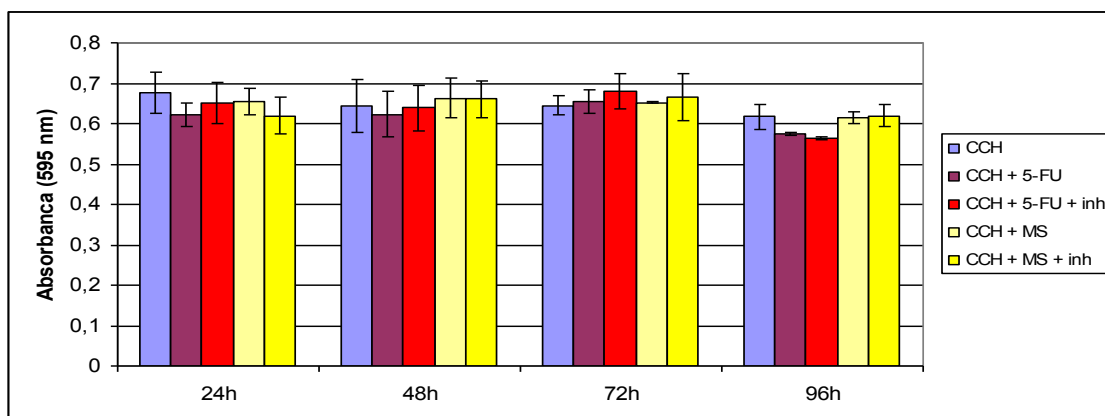
| Vzorci         | Povp 1.pon | Povp 2.pon | Povp 3.pon | Povprečje  |
|----------------|------------|------------|------------|------------|
| 1.dan neg.     | 0,66233333 | 0,772      | 0,59366667 | 0,676      |
| 1.dan 5-FU     | 0,59966667 | 0,681      | 0,58966667 | 0,62344444 |
| 1.dan 5-FU inh | 0,58566667 | 0,74766667 | 0,61966667 | 0,651      |
| 1.dan MS       | 0,605      | 0,71433333 | 0,64233333 | 0,65388889 |
| 1.dan MS inh   | 0,56366667 | 0,709      | 0,58366667 | 0,61877778 |
| 2.dan neg.     | 0,563      | 0,77266667 | 0,59233333 | 0,64266667 |
| 2.dan 5-FU     | 0,55333333 | 0,735      | 0,58033333 | 0,62288889 |
| 2.dan 5-FU inh | 0,58933333 | 0,75233333 | 0,57366667 | 0,63844444 |
| 2.dan MS       | 0,73466667 | 0,683      | 0,56833333 | 0,662      |
| 2.dan MS inh   | 0,705      | 0,70866667 | 0,57066667 | 0,66144444 |
| 3.dan neg.     | 0,65466667 | 0,68233333 | 0,598      | 0,645      |
| 3.dan 5-FU     | 0,70333333 | 0,65666667 | 0,60166667 | 0,65388889 |
| 3.dan 5-FU inh | 0,73433333 | 0,71533333 | 0,59466667 | 0,68144444 |
| 3.dan MS       | 0,65633333 | 0,647      | 0,654      | 0,65244444 |
| 3.dan MS inh   | 0,783      | 0,62333333 | 0,591      | 0,66577778 |
| 4.dan neg.     |            | 0,58533333 | 0,64833333 | 0,61683333 |
| 4.dan 5-FU     |            | 0,579      | 0,57133333 | 0,57516667 |
| 4.dan 5-FU inh |            | 0,56566667 | 0,56033333 | 0,563      |
| 4.dan MS       |            | 0,628      | 0,60133333 | 0,61466667 |
| 4.dan MS inh   |            | 0,646      | 0,594      | 0,62       |

Priloga D3:  
Povprečne absorbance pri a) celicah Jurkat in b) hrustančnih celicah glede na čas inkubacije pri testu določanja koncentracije proteinov

a)



b)



Liziranim celicam smo dodali barvilo Coomassie Brilliant Blue G-250 in po 10 minutni inkubaciji izmerili absorbance pri valovni dolžini 595 nm.

Legenda:

Jurkat – negativna kontrola: celice Jurkat gojene v optimalnem rastnem mediju

Jurkat + 5-FU – celice Jurkat z dodanim 5-FU

Jurkat + 5-FU + inh – celice Jurkat z dodanim 5-FU in s predvidenim dodatkom inhibitorja kaspaze-3\*

Jurkat + MS – celice Jurkat okužene z *M. synoviae*

Jurkat + MS + inh – celice Jurkat okužene z *M. synoviae* in s predvidenim dodatkom inhibitorja kaspaze-3\*

CCH – negativna kontrola: hrustančne celice gojene v optimalnem rastnem mediju

CCH + 5-FU – hrustančne celice z dodanim 5-FU

CCH + 5-FU + inh – hrustančne celice z dodanim 5-FU in s predvidenim dodatkom inhibitorja kaspaze-3\*

CCH + MS – hrustančne celice okužene z *M. synoviae*

CCH + MS + inh – hrustančne celice okužene z *M. synoviae* in s predvidenim dodatkom inhibitorja kaspaze-3\*

\* - inhibitor kaspaze-3 je bil dodan samo pri testu, kjer smo določali kaspazno aktivnost. Tu smo določili le koncentracijo celic, ki so bile okužene z *M. synoviae* ali 5-fluorouracilom (5-FU).