

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Rok MIRTEK

**DOLOČANJE CITOKINOV V SINOVIALNIH  
TEKOČINAH KOKOŠI, OKUŽENIH Z BAKTERIJO  
*Mycoplasma synoviae***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Rok MIRTEK

**DOLOČANJE CITOKINOV V SINOVIALNIH TEKOČINAH KOKOŠI,  
OKUŽENIH Z BAKTERIJO *Mycoplasma synoviae***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF CYTOKINES IN SYNOVIAL FLUIDS OF  
CHICKENS, INFECTED WITH BACTERIUM *Mycoplasma synoviae***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

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

Komisija za 1. In 2. stopnjo študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat in za recenzenta prof. dr. Alojza Ihana.

Mentorica: prof. dr. Mojca Narat

Recenzent: prof. Dr. Alojz Ihan

## Komisija za oceno in zagovor diplomskega dela:

Predsednik: prof. dr. Romana Marinšek Logar  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Mojca Narat  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Alojz Ihan  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za  
mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani Rok Mirtek se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Rok MIRTEK

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 577.27.083 : 636.5.09 (043) = 163.6  
KG imunologija/mikoplazme/*Mycoplasma synoviae*/bolezni perutnine/kužni sinovitis/protitelesa/citokini/določanje citokinov/interlevkini/interferoni  
AV MIRTEK, Rok  
SA NARAT, Mojca (mentorica)/IHAN, Alojz (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
LI 2011  
IN DOLOČANJE CITOKINOV V SINOVIALNIH TEKOČINAH KOKOŠI OKUŽENIH Z BAKTERIJO *Mycoplasma synoviae*  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 39 str., 11 pregl., 10 sl., 47 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI *Mycoplasma synoviae* je bakterija, ki okužuje zgornji dihalni trakt ptic. Občasno se razširi po telesu in lahko preide skozi sinovialne membrane ter povzroča vnetje sklepnih ovojnici (sinovitis). Ta bakterija aktivira imunske pa tudi neimunske celice, ki proizvajajo in izločajo različne, predvsem vnetne citokine. S serološkimi testi je bila dokazana prisotnost okužbe pri osemnjstih kokoših, ki smo jim odvzeli vzorce sinovialne tekočine. Najprej smo s posrednim imunoencimskim testom na nitrocelulozni membrani (DIBA) ugotovili, da so v sinovialnih tekočinah prisotni različni imunski mediatorji vnetja. Z natančnejšo analizo smo z SDS PAGE elektroforezo ločili proteine v vzorcih sinovialnih tekočin ter jih prenesli na nitrocelulozno membrano. Različne vrste citokinov (IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, INF $\alpha$  in IFN $\gamma$ ) smo detektirali z uporabo specifičnih primarnih protiteles in s hrenovo peroksidazo označenih sekundarnih protiteles. Analizirali smo tudi nekaj vzorcev sinovialnih tekočin iz neokuženih živali. V testiranih vzorcih okuženih živali smo dokazali prisotnost različnih citokinov. Ugotovili smo, da so se vzorci sinovialnih tekočin med seboj razlikovali po tem, kateri citokini so prisotni, in tudi po vsebnosti posameznih citokinov.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 577.27.083 : 636.5.09 (043) = 163.6  
CX immunology/mycoplasma/*Mycoplasma synoviae*/poultry diseases/infectious synovitis/antibodies/cytokines/determination of cytokines/interleukins/interferons  
AU MIRTEK, Rok  
AA NARAT, Mojca (supervisor)/IHAN, Alojz (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2011  
TI DETERMINATION OF CYTOKINES IN SYNOVIAL FLUIDS OF CHICKENS, INFECTED WITH BACTERIUM *Mycoplasma synoviae*  
TD Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 39 p., 11 tab., 10 fig., 47 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB *Mycoplasma synoviae* is a bacterium that infects the upper respiratory tract of birds. Occasionally it spreads around the body and can pass through the synovial membrane and causes an inflammation of the joint capsules (synovitis). This bacterium activates immune and nonimmune cells that produce and secrete various, mainly inflammatory cytokines. By the use of serological tests, the infection was confirmed in eighteen chickens, from which we collected samples of synovial fluid. By using indirect immuno-enzymatic test on nitrocellulose membrane (DIBA), we found that there are various immune mediators of inflammation present in samples of synovial fluid. For detailed analysis we used SDS PAGE electrophoresis to separate proteins in synovial fluid samples and transferred them to nitrocellulose membrane. Different types of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, INF $\alpha$  and IFN $\gamma$ ) were detected using specific primary antibodies and horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies. We also analyzed some samples of synovial fluids from animals that were not infected. In the tested samples from infected animals, we demonstrated the presence of different cytokines. We found that synovial fluid samples differed after which cytokines are present as well as by the content of individual cytokines.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO PREGLEDNIC .....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	IX

<b>1</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1	NAMEN DELA .....	2
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1	MIKOPLAZME.....	3
2.1.1	<i>Mycoplasma synoviae</i> .....	4
2.1.2	Kužni sinovitis.....	4
2.2	IMUNSKI ODZIV NA BAKTERIJSKO OKUŽBO .....	5
2.2.1	Celice, ki sodelujejo pri vnetnem odzivu .....	7
2.2.1.1	Nevtrofilci (heterofilci).....	7
2.2.1.2	Monociti/Makrofagi.....	7
2.2.1.3	Eozinofilci .....	7
2.2.1.4	Limfociti .....	8
2.2.1.5	Celice naravne ubijalke (NK celice).....	8
2.3	CITOKINI .....	9
2.3.1	Interlevkin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) .....	10
2.3.2	Interlevkin-6 (IL-6).....	10
2.3.3	Interlevkin-12 (IL-12).....	11
2.3.4	Interlevkin-18 (IL-18).....	11
2.3.5	Interlevkin-2 (IL-2).....	11
2.3.6	Interferoni (IFN).....	12
2.3.7	Citokini pri artritičnih procesih.....	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>17</b>
3.1	SEROLOŠKE ANALIZE.....	17
3.2	POSREDNI IMUNOENCIMSKI TEST (DIBA).....	17

3.3	SDS-PAGE ELEKTROFOREZA .....	18
3.3.1	Priprava vzorcev.....	<b>18</b>
3.3.2	Priprava gelov .....	19
3.3.3	Elektroforeza.....	20
3.3.4	Prenos proteinov na membrano (»western blot«).....	21
3.3.5	Barvanje proteinov z barvilkom Coomassie Blue.....	22
3.3.5.1	Barvanje gela .....	22
3.3.5.2	Barvanje membrane .....	23
3.3.6	Detekcija citokinov na nitrocelulozni membrani.....	23
4	<b>REZULTATI.....</b>	<b>24</b>
4.1	REZULTATI SEROLOŠKIH ANALIZ .....	24
4.2	REZULTATI POSREDNEGA IMUNOENCIMSKEGA TESTA (DIBA) .....	25
4.3	USPEŠNOST PRENOSA PROTEINOV NA MEMBRANO.....	26
4.4	REZULTATI DETEKCIJ CITOKINOV NA MEMBRANAH .....	27
5	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>29</b>
5.1	RAZPRAVA.....	29
5.2	SKLEPI.....	31
6	<b>POVZETEK.....</b>	<b>33</b>
7	<b>VIRI .....</b>	<b>35</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled poglavitnih citokinov pri pticah, celic, ki te citokine proizvajajo in funkcij, ki jih citokini opravljajo v organizmu ob prisotni okužbi (McInnes in Schett, 2007; Goldsby in sod., 2000).....	15
Preglednica 2: Primarna zajčja in mišja protitelesa, ki smo jih uporabili pri izvedbi posrednega imunoencimskega testa (DIBA) in redčitve v 0,05-odstotni Tween PBS. ....	17
Preglednica 3: Pregled vzorcev sinovialnih tekočin okuženih kokoši in uporabljeni redčitve. ....	19
Preglednica 4: Reagenti, ki so potrebni za pripravo 15 ml 15-odstotnega ločitvenega gela. ....	19
Preglednica 5: Reagenti, ki so potrebni za pripravo 5 ml 5-odstotnega nabijalnega gela... ..	19
Preglednica 6: Reagenti, ki so potrebni za pripravo 1 L 10 x koncentriranega elektroforeznega pufra. ....	20
Preglednica 7: Reagenti, ki so potrebni za pripravo 1 L 1 x koncentriranega elektroforeznega pufra. ....	20
Preglednica 8: Reagenti, ki so potrebni za pripravo 1 L 10 x pufra CAPS. ....	21
Preglednica 9: Reagenti, ki so potrebni za pripravo 1 L pufra za prenos. ....	21
Preglednica 10: Pregled rezultatov seroloških analiz, izolacije in PCR reakcije z bakterijo <i>Mycoplasma synoviae</i> okuženih kokoši.....	24
Preglednica 11: Prikaz vsebnosti posameznih citokinov v različnih vzorcih sinovialnih tekočin, označenih s številkami od 1 do 18, glede na intenziteto modro-vijolične barve s slike 10. ....	28

## KAZALO SLIK

Slika 1: Kokošja noge okužena z bakterijo <i>Mycoplasma synoviae</i> (Lockaby in sod., 1998). .....	5
Slika 2: Shematični prikaz ptičjih krvnih celic in celic, ki sodelujejo pri vnetnem odzivu (Avian Blood ..., 1996). ....	9
Slika 3: Sinergistično delovanje vnetnih citokinov ob prisotnosti virusne ali bakterijske okužbe (ABCAM®, 2011). .....	14
Slika 4: Postopek priprave zbiralnega in ločitvenega gela za izvedbo elektroforeze (SDS- PAGE Acrylamide gel, 2009). ....	20
Slika 5: Slikovni prikaz izvedbe SDS-PAGE elektroforeze (SDS-PAGE Electrophoresis, 2009). ....	21
Slika 6: Potek prenosa proteinov iz gela na membrano (Western blot transfer, 2009). ....	22
Slika 7: Potek detekcije proteinov na nitrocelulozni membrani s primarnimi in sekundarnimi protitelesi po elektroforezi in prenosu proteinov iz gela na membrano (Komabiotech, 2008). ....	23
Slika 8: Prikaz združenih membran posrednega encimskoimunskega testa (DIBA), s katerim smo dokazovali prisotnost določenih citokinov v različnih vzorcih sinovialnih tekočin kokoši. ....	25
Slika 9: Skenirana slika nitrocelulozne membrane po končanem prenosu iz poliakrilamidnega gela in barvanju z barvilm Coomassie Blue. ....	26
Slika 10: Prikaz rezultatov detekcije različnih citokinov na membranah. ....	27

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APS	amonijev persulfat ( <u>ammonium persulfate</u> )
CAPS	N-cikloheksil-3-aminopropansulfonska kislina
CD	podvrsta limfocitov T ( <u>cluster of differentiation</u> )
ddH <sub>2</sub> O	dvojno destilirana voda
DIBA	posredni imunoencimski test ( <u>dot immunobinding assay</u> )
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DTT	dithiothreitol
EBP	elektroblotting pufer
FcR	receptor ta Fc del imunoglobulinov
GTP	guanozin-tri-fosfat
IFN	interferon
IgG	imunoglobulin razreda G
IL	interlevkin
JAK	samo še ena kinaza ( <u>just another kinase</u> )
kDa	kilodalton, enota za molekulsko maso
mA	miliampjer
MAP	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza
MeOH	metanol
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks ( <u>major histocompatibility complex</u> )
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NaOH	natrijev hidroksid
NK	naravne celice ubijalke
NO	dušikov monoksid
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	fosfatni pufer ( <u>phosphate buffer solution</u> )
PCR	verižna reakcija s polimerazo ( <u>polymerase chain reaction</u> )
PGE2	prostoglandin E2
RB	pufer, ki se uporablja za potek SDS-PAGE elektroforeze ( <u>running buffer</u> )
RF	rastni faktor
SDS	natrijev dodecil sulfat ( <u>sodium dodecyl sulfate</u> )
STAT	signalni prenašalec in aktivator transkripcije ( <u>signal transducer and activator of transcription</u> )
TCR	T celični receptor
TEMED	tetrametiletilen-diamin
TNF	dejavnik tumorske nekroze ( <u>tumor necrosis factor</u> )
TPBS	Tween 20-PBS

## 1 UVOD

*Mycoplasma synoviae* je patogena bakterija, ki najpogosteje okužuje ptice, predvsem purane in kokoši. V intenzivni perutninski proizvodnji povzroča velike ekonomske izgube, ker zmanjša prirast in nesnost perutnine. Med evolucijo se je *Mycoplasma synoviae* popolnoma prilagodila parazitskemu življenju, saj je izgubila večino genov, ki omogočajo sintezo esencialnih molekul. Da lahko preživi znotraj gostitelja in se izogiba njegovemu imunskemu sistemu, uporablja nekatere mehanizme patogenosti. Med te prištevamo sposobnost adherence na gostiteljevo tarčno celico, vdiranje v celice, spodbujanje celične apoptoze, molekularno (antigenško) mimikrijo, ki lahko vodi do tolerance gostitelja na prisotnost bakterije ter supresije celičnega in humorala negativnega imunskega sistema. Mikoplazme stimulirajo makrofage, monocite, celice T in celice NK, kar privede do produkcije različnih molekul, kot so dejavniki tumorske nekroze (TNF alfa), interlevkini (IL-1, 2, 6) in interferoni (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  in IFN $\gamma$ ). *Mycoplasma synoviae* skupaj s temi molekulami inducira močan humorálni in celični imunski odgovor. V določenih (nepojasnjenih) okoliščinah pa lokalna okužba preide v sistemsko in lahko povzroči vnetje sklepov, imenovano infekciozni (kužni) sinovitis (IS), ki ima značilnosti avtoimunske bolezni kokoši (Razin in Tully, 1995; Nascimento in sod., 2005; Razin in sod., 1998).

To je akutna ali kronična bolezen kokoši in puranov, ki napade predvsem sinovialne membrane sklepov in povzroči vnetje ovojnici (sinovitis) (Kleven, 2003). Tako kot pri vseh vretenčarjih je tudi pri kokoših imunski sistem dobro razvit. Prirojena (naravna) in pridobljena (specifična) imunost, pri kateri nastajajo tudi protitelesa proti imunogenim proteinom, se med seboj dopolnjujeta (Janeway in sod., 2001). Pri bakterijski okužbi imajo ključni pomen citokini (proteini z majhno molekulsko maso, ki delujejo kot posredniki med elementi imunskega sistema). Citokini so molekule, ki jih proizvajajo različne imunske celice in usmerjajo odziv organizma. Delujejo na različne celice in pospešujejo zdravljenje okužbe in odstranjevanje mikrobov pa tudi organizmu lastnih okuženih celic. Različni citokini imajo v organizmu različne funkcije. Tako na primer IL-6 in IFN $\gamma$  spodbujata zorenje in diferenciacijo limfocitov B v plazmatke in posledično povečano produkcijo protiteles. IFN $\alpha$  spodbuja ali zavira izdelovanje protiteles. IL-1 beta aktivira makrofage in limfocite T, kar privede do produkcije drugih citokinov, hkrati pa poviša tudi telesno temperaturo organizma (McInnes in Schett, 2007; Goldsby in sod., 2000).

V času okužbe z bakterijo *Mycoplasma synoviae* se v sinovialni tekočini močno povišajo koncentracije različnih vnetnih celic in proteinov. Posledica povišanja koncentracije vnetnih celic je tudi povišana koncentracija citokinov, ki jih te celice proizvajajo. Zanimalo nas je, kateri citokini so prisotni v sinovialni tekočini ob okužbi z bakterijo *Mycoplasma synoviae* ter kakšna je bila zastopanost posameznih citokinov v različnih vzorcih sinovialne tekočine. Proteine v sinovialni tekočini smo najprej ločili z SDS-PAGE elektroforezo, jih prenesli na nitrocelulozno membrano z metodo »Western blot« ter nato

detektirali s specifičnimi primarnimi in s hrenovo peroksidazo označenimi sekundarnimi protitelesi.

### 1.1 NAMEN DELA

Namen dela je bil določiti, katere citokine lahko najdemo v sinovialni tekočini kokoši ob okužbi z bakterijo *Mycoplasma synoviae*. Predvidevali smo, da bomo z uporabo specifičnih primarnih in s hrenovo peroksidazo označenih sekundarnih protiteles dokazali prisotnost nekaterih imunskih molekul, ki so značilne za vnetja, kot na primer: IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, IFN $\alpha$  in IFN $\gamma$ .

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MIKOPLAZME

Mikoplazma je splošno poimenovanje za bakterije razreda *Mollicutes*. Zaradi močno reduciranega genoma te bakterije niso sposobne opravljati številnih metabolnih funkcij, kot sta produkcija celične stene in sinteza purinov. Ena izmed možnih razlag za redukcijo genoma je, da so se molikuti evolucijsko razvili v obligatne parazite, zaradi česar so mnoge metabolne poti postale nepotrebne. Za predstavnike razreda *Mollicutes* je značilno, da so brez celične stene. Obdaja jih le citoplazemska membrana, ki ostaja stabilna zaradi sterolov. So najmanjši znani prokarioti, ki so sposobni samostojnega razmnoževanja. Njihove celice so velike od 0,2 do 0,5  $\mu\text{m}$  in so kokoidne, paličaste, filamentozne ali obročaste oblike. Zgrajene so iz minimalnega nabora struktur, med katere prištevamo citoplazemsko membrano, ribosome in močno navit krožni kromosom (Maniloff in Jack, 1992).

Mikroorganizmi, ki so uvrščeni v razred *Mollicutes* so popolnoma odvisni od svojih gostiteljev in njihovih hrani. Ker je za bakterije rodu *Mycoplasma* bistveno, da so sposobne vezave na gostiteljsko celico, so v ta namen razvile poseben tip proteinov, ki jim je namenjen velik del genoma. Pritrditev (adhezija) je pogoj za kolonizacijo tkiv in okužbo, zato je pomemben patogeni dejavnik pri mikoplazmah prisotnost citadhezinov, ki omogočijo pritrditev na gostiteljsko celico (Razin in sod., 1998).

Mikoplazme okužujejo širok spekter organizmov, med katere prištevamo ljudi, rastline, živali in insekte. Pri ljudeh in živalih najpogosteje naselijo sluznice dihalnega in urogenitalnega trakta, prebavil, mlečnih žlez, oči in sklepov. Mnoge vrste rodu *Mycoplasma* so komenzali, ki neškodljivo živijo z njihovim gostiteljem kot del mikroflore telesa. Okužbe, ki jih lahko povzročajo, so navadno blage in kronične in le redko povzročijo smrt gostitelja. Poškodbe so najverjetneje posledica vnetja in imunskega odziva, ki škoduje tkivu gostitelja (Maniloff in Jack, 1992).

Mikoplazme v svojem gostitelju rastejo izjemno počasi in celo pri optimalnih pogojih, v laboratoriju (»*in vitro*«), je njihov podvojevalni čas okoli 9 ur. Prav tako imajo izjemno dolgo fazo prilagoditve (tako imenovano »lag« fazo), tako da lahko preteče več tednov, preden so opazne kolonije na gojišču. Mikoplazme potrebujejo navadno s proteini bogat medij, z dodatkom 10–15 % živalskega serumca, ki je med drugim tudi vir maščobnih kislin in holesterola za celično membrano. *Mycoplasma Synoviae* potrebuje še nikotinamid adenin dinukleotid (NAD). Po od treh do desetih dneh gojenja pri 37 °C se tvorijo kolonije na agarju. Tipične kolonije so majhne (0,1–1,0 mm), gladke, okrogle in imajo osrednjo izboklino (Maniloff in Jack, 1992).

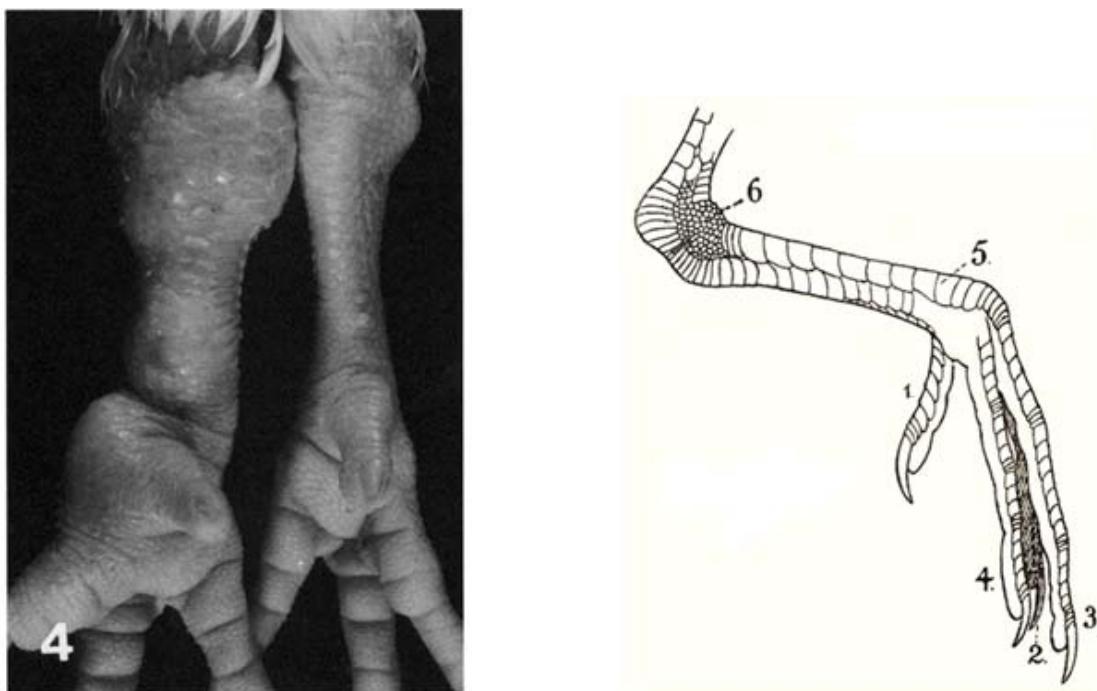
### **2.1.1 *Mycoplasma synoviae***

*Mycoplasma synoviae* je gram negativna bakterija, ki povzroča bolezni dihalnega trakta, ki so pogosto brez kliničnih znakov, in včasih tudi vnetje sluznice v sklepih ptic, tako imenovani kužni sinovitis. Primarni habitat te bakterije je sluznica dihalnega trakta ptic. Okužba se začne s pritrditvijo bakterije na gostiteljsko celico s pomočjo specifičnih površinskih proteinov in adhezinov. Zaradi počasne rasti bakterija ostane v gostitelju dolgo časa in sama ne povzroči smrti živali, ampak le oslabi njen imunski sistem. To omogoči lažji vstop virusom, ki povzročijo kužni bronhitis ali druge vrste dihalnih bolezni, ki lahko privedejo do smrti živali. Posamezni sevi (izolati) *Mycoplasma synoviae* se med seboj razlikujejo po patogenosti. Nekateri sevi ne povzročijo nobenih bolezenskih znakov, medtem ko drugi povzročajo bolezni dihal in redko tudi vnetje sklepnih ovojnici (kužni sinovitis). Na potek okužbe v naravnem okolju vplivajo tudi okoljski dejavniki (prisotnost virusov, bakterij, prahu, nizka temperatura) (Lockaby in sod., 1998, 1999; Vasconcelos in sod., 2007; Kleven, 2003).

### **2.1.2 Kužni sinovitis**

Kužni sinovitis je akutna ali kronična bolezen kokoši in puranov, za katero je značilno vnetje sklepnih ovojnici (sinovitis). Akutna okužba navadno nastopi pri piščancih, starih od 4 do 16 tednov, in puranih, starih od 10 do 24 tednov. Občasno lahko do akutne okužbe pride tudi pri odraslih kokoših. Akutni okužbi po navadi sledi kronična okužba, ki lahko traja celo življenje. Klinični znaki se kažejo v zmanjšani rasti, bledem grebenu, nasršenem perju in oteklih sklepih. Smrtnost pri sinovitisu je največkrat od 5- do 15-odstotna, lahko pa niha od 2 do 75 odstotkov (Kleven, 2003).

Okužba z bakterijo *Mycoplasma synoviae* se lahko prenaša horizontalno preko dihalnega trakta na druge kokoši ali vertikalno skozi valilna jajca. Zaradi učinkovitega prenosa med gostitelji bakterija *Mycoplasma synoviae* povzroča velike ekonomske izgube v intenzivni perutninski industriji, saj so takšne živali neprimerne za živilo (Vasconcelos in sod., 2007; Kleven, 2003).



Slika 1: Kokošja noge okužena z bakterijo *Mycoplasma synoviae*. Rezultat poizkusa, ki ga je izvedel Lockaby s sodelavci, je prikazan na levri sliki. Otečeni sklepi kokošje leve noge so posledica namerne okužbe z bakterijo *Mycoplasma synoviae*, medtem ko desna nogička služi kot negativna kontrola (ostaja neokužena) (Lockaby in sod., 1998). Na desni sliki je prikazana kokošja nogička in označeni so deli, ki jih bakterija *Mycoplasma synoviae* najpogosteje prizadane (1–4: prsti, 5: podplatni del, 6: skočni sklep).

## 2.2 IMUNSKI ODZIV NA BAKTERIJSKO OKUŽBO

Ko pride do bakterijske okužbe organizma, se aktivirajo različne vrste obrambnega odziva: vnetni, fagocitni, protitelesni in celični. Posamezne vrste patogenih mikrobov se med seboj razlikujejo po načinih, kako povzročajo bolezen, in tudi po tem, kakšni obrambni mehanizmi se sprožijo v gostitelju. V evoluciji so se oblikovale različne vrste imunskega odzivanja, ki so učinkovite za določene skupine patogenih povzročiteljev. Če je imunski odziv dovolj močan, pride v tkivu do razmeroma hitrega uničenja in odstranitve patogenih mikrobov. Če pa do tega ne pride (zaradi narave mikroorganizma, zaradi oslabljenega ali napačno uravnvanega imunskega odziva gostitelja), lahko nastane kronično vnetje. Slednje dolgoročno spremeni delovanje tkiva, ker produkti imunskega sistema povzročajo uničevanje tkivnih celic, vnetni mediatorji pa zaradi spodbujanja popravljalnih procesov povzročajo propad tkiva (Roitt in sod., 2001).

Vdor mikrobov v telo skozi kožo ali sluznice v okuženem tkivu povzroči reakcijo. Imenujemo jo vnetje, ki je vnaprej pripravljen odziv tkiva na kakršno koli okvaro. Ne glede na vzrok (mikrobni, fizikalni, kemični) okvare ali poškodbe tkiva ji sledi sosledje tkivnih reakcij, ki na mestu okvare močno okrepijo obrambno zmožnost tkiva: poveča se prekrvljenost tkiva, poveča se prepustnost kapilar, omogoči se prehod zaščitnih makromolekul (protiteles, proteinov komplementa) iz žil v tkivo, vnetni mediatorji povzročijo kopiranje obrambnih celic in njihovo aktivacijo (Roitt in sod., 2001).

Hkrati z aktivacijo obrambnih sposobnosti poškodovanega tkiva potekajo tudi obnovitveni procesi, katerih namen je zacetiti poškodbo. Vnetje delimo na akutno in kronično. Akutno traja praviloma od nekaj minut do nekaj dni, značilne vnetne celice v tkivu so nevtrofilci. Kronično vnetje traja dlje časa, njegovo vzdrževanje pa praviloma omogoča medsebojno sodelovanje makrofagov in limfocitov T. Kronično vnetje navadno sledi akutnemu vnetju, ker povzročitelj vztraja v tkivu in ga obrambni mehanizmi ne zmorajo odstraniti (Roitt in sod., 2001).

Vsek vnetni odziv poteka v medsebojnem sodelovanju raznovrstnih in številnih celic (nevtrofilcev, makrofagov, celic T pomagalk, citotoksičnih limfocitov T, limfocitov B, celic NK). Na mestu vdora mikrobov v telo se morajo ustrezne celice zbrati in z medsebojnim signaliziranjem uskladiti svoje aktivnosti v primerno organiziran imunskega odziva. Za medsebojno signaliziranje uporabljajo imunske celice neposredne stike, ki jih omogočajo receptorske povezave (zlasti prek adhezijskih molekul). Zelo pomembno je tudi medcelično signaliziranje prek topnih proteinskih signalnih molekul – citokinov (citokin dobesedno pomeni “celični premikalec”). Z izločanjem citokinov posamezna imunska celica vpliva na delovanje drugih celic, ki so običajno v njeni neposredni sosedstvi (Roitt in sod., 2001).

Številne bakterije parazitirajo znotraj celic, pogosto celo znotraj fagocitnih celic. Znotrajcelične bakterije so tako nedostopne za protitelesa. Mnoge znotrajcelične bakterije pospešujejo fagocitozo in jo izrabljajo za vstop v celice. Nato z različnimi prilagoditvami preprečijo, da bi jih fagocitne celice uničile. V takšnem primeru so izjemno pomembne celice NK, ki se aktivirajo zgodaj med okužbo in izločajo velike količine interferona gama (INF  $\gamma$ ). Ta aktivira makrofage in jim okrepi fagocitno zmožnost. To navadno zavre okužbo in omogoči razvoj specifične celične imunske reakcije, ki je najpomembnejša za obrambo. Specifično obrambo proti znotrajceličnim bakterijam omogočajo predvsem citotoksični limfociti T, ki uničujejo okužene celice lastnega telesa, s čimer zamejujejo širjenje okužbe (Roitt in sod., 2001; Koren in sod., 2007).

## 2.2.1 Celice, ki sodelujejo pri vnetnem odzivu

### 2.2.1.1 Nevtrofilci (heterofilci)

So prve celice, ki so rekrutirane na mesto vnetja (prva obrambna linija). Predstavljajo od 50 do 60 % vseh levkocitov v krvnem obtoku. Njihova glavna naloga je fagocitoza mikrobov in odmrlih celic. Aktivirajo jih citokini, kompleksi antigen-protitelo ali komponentne komplementa. Po aktivaciji nevtrofilci migrirajo skozi endotelij in vezivno tkivo na mesto vnetja, kjer izločajo reaktivne kisikove spojine (Abbas in Lichtman, 2006). Nevtrofilci ptičev so imenovani heterofilci. Oksidativni odgovor v heterofilcih je mnogo šibkejši v primerjavi z odgovorom v sesalskih nevtrofilcih, zato se ptičji heterofilci nekoliko razlikujejo od sesalskih, saj uporabljajo predvsem neoksidativne mikrobocidne mehanizme. Ob izpostavitvi patogena preidejo kokošji heterofilci skozi respiratorni izbruh. Pri tem se sprosti večja količina kisika, ki oksidira glukozo, vendar heterofilci ne uspejo proizvesti velikih količin vodikovega peroksida ali superoksidnih ionov, kot je značilno za nevtrofilce sesalcev (Penniall in Spitznagel, 1975; Stabler s sod., 1994). Kokošji heterofilci prav tako ne vsebujejo katalaze in mieloperoksidaze. Čeprav jim primanjkuje učinkovit oksidativni mehanizem, so heterofilci zelo učinkoviti pri uničevanju bakterij (Brune in sod., 1972; Brune in Spitznagel, 1973).

### 2.2.1.2 Monociti/Makrofagi

Monociti in makrofagi ptic in sesalcev so si podobni. Monociti so nezreli levkociti, ki potujejo po krvnem obtoku, znotraj katerega ne predstavljajo obrambne linije, saj se ne aktivirajo. Ko pa vstopijo v tkivo, se povečajo (tudi do petkrat) in jih imenujemo makrofagi. Poznamo mobilne in nemobilne makrofage. Mobilni potujejo po tkivu, nemobilni pa se na tkivo pritrđijo. Vendar lahko tudi nemobilni postanejo mobilni, če so zahteve telesa takšne. Makrofagi so zelo uspešni pri fagocitozi, sposobni so fagocitirati tudi do 100 bakterij. Po opravljeni nalogi lahko izločijo prebavljene in nepotrebne ostanke fagocitiranega delca. Njihova naloga je tudi predstavljanje antigenov na površini. Pomembni so pri vzdrževanju kroničnega vnetnega stanja. Izločajo citokine (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), kemokine, prostaglandine in prokoagulante (Abbas in Lichtman, 2006).

### 2.2.1.3 Eozinofilci

Predstavljajo 2 % vseh levkocitov v krvi. So šibki fagociti. Pomembni so pri okužbah s paraziti. Pritrdijo se na parazite in sproščajo kisikove radikale, citokine in prostaglandine, ki nato ubijejo parazite. Eozinofilci na mestu vnetja detoksificirajo vnetne mediatorje in uničujejo komplekse antigen-protitelo. Na ta način preprečujejo širjenje vnetja (Roitt in sod., 2001). Eozinofilci ptic so zelo podobni heterofilcem. Razlikujemo jih po njihovi okrogli obliki in barvi citoplazme. Njihovo delovanje pri pticah ni dobro raziskano.

#### 2.2.1.4 Limfociti

Limfociti predstavljajo 20–35 % vseh levkocitov. Nastajajo v rdečem kostnem mozgu. Zaradi sposobnosti uničevanja tujih zajedalcev (bakterij, mikrobov in virusov) predstavljajo glavni del obrambnih mehanizmov v specifični obrambi. Ločimo limfocite T, limfocite B ter naravne celice ubijalke.

##### Limfociti T

- Celice T pomagalke (CD4): po aktivaciji z antigenom izločajo medcelične mediatorje citokine, ki uravnavajo delovanje drugih limfocitov.
- Citotoksični limfociti T (CD8): po aktivaciji z antigenom izločajo citotoksične snovi in tako z inducirano apoptozo ubijajo lastne celice, ki so okužene z znotrajceličnimi mikrobi, kot so virusi in paraziti.

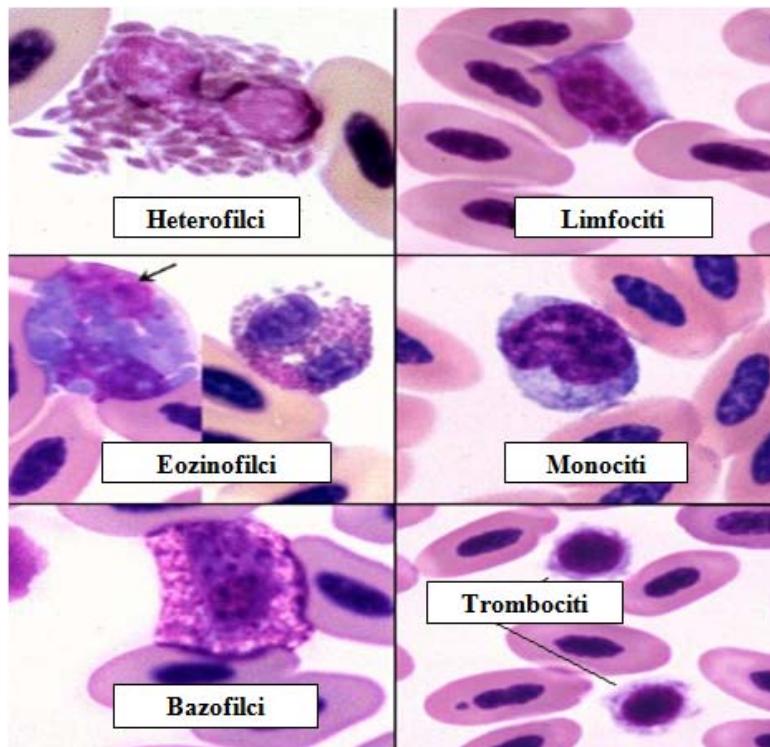
##### Limfociti B

Po stiku z antigenom pride do aktivacije limfocitov B, ki se začnejo razmnoževati in se diferencirati bodisi v spominske limfocite B, ki živijo tudi do več 10 let, bodisi v plazmatke. Te obstojijo le nekaj dni in v tem času izločijo velike količine protiteles s hitrostjo od 2000 do 20000 molekul na sekundo. Plazmatka izloča protiteesa enake specifičnosti, kot jo imajo antigenski receptorji tistega limfocita B, iz katerega je tudi sama nastala (Goldsby in sod., 2000).

#### 2.2.1.5 Celice naravne ubijalke (NK celice)

Celice naravne ubijalke so citotoksični limfociti, ki spontano in brez poprejšnje senzibilizacije uničijo različne tarčne celice. Nimajo lastnosti klasičnih makrofagov, granulocitov ali citotoksičnih limfocitov T. Njihov fenotip se razlikuje od celic B in T ter nimajo imunskega spomina. Nastanejo v kostnem mozgu iz velikih granularnih limfocitov, nato pa se nahajajo v vranici, limfnih vozlih in periferni krvi. Za razliko od limfocitov T ne potrebujejo zorenja v timusu. Celice naravne ubijalke prepoznajo in uničijo celice, ki ne izražajo molekul MHC razreda I. Do zmanjšanega izražanja teh molekul lahko pride zaradi prisotnosti znotrajceličnega mikroorganizma ali nastanka tumorjev. Stimulacija z interlevkinom-12 ali TNF povzroči sproščanje IFN $\gamma$  iz celic naravnih ubijalk, ta pa aktivira makrofage. Drugo delovanje vključuje pritrjevanje celic ubijalk na membrano, sledi izločanje perforinov, beljakovin, ki napravijo transmembranske kanalčke v citoplazemski membrani tarčnih celic in povzročijo ozmotsko lizo (Koren in sod., 2007; Goldsby in sod., 2000). Pri pticah so bile odkrite celice, ki imajo podobno funkcijo kot celice naravne ubijalke pri sesalcih. Te so bile prepoznane kot citoplazemski CD3 $^{+}$  in površinski T celični

receptor (TCR)/CD3<sup>+</sup> (TCRO) limfociti, ki pogosto izražajo CD8 molekule (Göbel in sod., 1994).



Slika 2: Shematični prikaz ptičjih krvnih celic in celic, ki sodelujejo pri vnetnem odzivu (Avian Blood Cells, 1996).

### 2.3 CITOKINI

Citokini so majhne beljakovinske molekule, ki po navadi delujejo v pikomolarnih koncentracijah. Izločajo jih celice, ki imajo pomembno vlogo pri imunskega sistema. Njihova glavna funkcija je aktivacija in regulacija celic imunskega sistema. Vrsta citokina, ki se proizvede kot posledica neke okužbe, je odvisna od vrste in funkcije celice, ki citokin proizvaja. Na primer: epitelijske celice lahko proizvedejo citokine, ki so vpletene pri vnetnem odzivu (tako imenovani vnetni citokini, interlevkin-6 in interlevkin-8), medtem ko makrofagi lahko proizvedejo tako vnetne citokine kot citokine, vpletene pri aktivaciji in regulaciji celic pomagalk (celic T CD4). Vsi citokini delujejo preko receptorjev na površini tarčnih celic. To lahko privede do povišanja ali znižanja celične aktivnosti. Glede na njihovo aktivnost lahko citokine razdelimo v več skupin: interlevkini (IL), interferoni (IFN), rastni faktorji (RF), dejavniki tumorske nekroze (TNF) in kemokini. Imena pogosto temeljijo na določeni lastnosti citokina (na primer: dejavniki tumorske nekroze so dobili ime po sposobnosti, da delujejo na tumorske celice) (Roitt in sod., 2001).

### 2.3.1 Interlevkin-1 beta (IL-1 $\beta$ )

Pri sesalcih se IL-1 $\beta$  proizvaja ob stimulaciji različnih celic zaradi prisotnosti mikroorganizmov ali njihovih produktov (Dinarello, 1998). Zrela oblika interlevkina-1 beta z molekulsko maso 17 kDa nastane s proteolitično cepitvijo 31 kDa velikega prekurzorja, ki ga cepi encim kaspaza 1. Z vezavo aktivnega IL-1 $\beta$  na receptor se sproži prenos signala preko hidrolize GTP molekule in aktivacije MAP kinaze. IL-1 $\beta$  ima glavno vlogo aktivacije imunskega sistema pri akutnem vnetju. Aktivira lahko makrofage in limfocite T, kar vodi do produkcije drugih citokinov in kemokinov. Posledično IL-1 $\beta$  povzroči povišanje telesne temperature, zaradi česar je v zgodovini dobil ime »endogeni pirogen«. V nekaterih primerih lahko njegova toksičnost vodi do resnih zapletov, kot je na primer septični šok (Dinarello, 1998).

Pri kokoših je bil odkrit polipeptid, ki ima 25-odstotno struktурno podobnost človeškemu IL-1 $\beta$ . Nadaljne študije polipeptida so pokazale, da je homologen sesalskemu IL-1 $\beta$ . Geni, ki kodirajo kokošji IL-1 $\beta$ , imajo podobno strukturo kot pri sesalcih in predstavljajo  $\frac{1}{4}$  sesalskih genov za IL-1 $\beta$ . Kokošji receptor za IL-1 $\beta$  ima 60-odstotno aminokislinsko podobnost človeškim in mišjim receptorjem za IL-1 $\beta$ . Producija IL-1 $\beta$  je pričakovana pri večini okužb pri pticah, pri katerih se pojavi vnetni odziv (Kaiser in sod., 2001).

### 2.3.2 Interlevkin-6 (IL-6)

IL-6 je večnamenski citokin, ki ga proizvajajo različne celice (monociti, sinovialni fibroblasti, limfociti B, limfociti T) in je vpletен pri akutnem odgovoru, imunski regulaciji in hematopoezi. IL-6 ima več vplivov na imunski sistem, vključno z aktivacijo limfocitov B in T. Vpliva tudi na produkcijo in razvoj makrofagov. Je eden najpomembnejših mediatorjev vročine, saj je sposoben preiti krvno možgansko bariero. V hipotalamusu povzroči začetek sinteze prostoglandina PGE2 in tako spremeni (poviša) nastavljenotočko telesne temperature. IL-6 sesalcev je glikoprotein z molekulsko maso med 21 in 28 kDa. Njegov receptor je sestavljen iz 80 kDa IL-6 vezavnega proteina (alfa veriga) in iz glikoproteina 130 (gp130) (beta veriga), 130 kDa velikega transmembranskega signalnega proteina. Vezava IL-6 na receptor povzroči prenos signala po poti JAK-STAT (tirozinska kinaza) in fosforilacijo gp130 podenote, kar privede do aktivacije signalne transdukcijske in aktivacije prepisovanja (STAT) genov. Nastali proteini preko različnih signalnih poti privedejo do aktivacije različnih funkcij IL-6, kot so: zorenje in diferenciacija limfocitov B ter produkcija protiteles; hematopoeza in trombopoeza; zorenje limfocitov T, njihova diferenciacija in citotoksičnost; povečanje nevroendokrinskih učinkov (Hirano, 1998). Kokošji IL-6 ima podobno zgradbo kot sesalski IL-6 in ima 35-odstotno aminokislinsko podobnost človeškemu IL-6 (Kaiser in sod., 2001).

### 2.3.3 Interlevkin-12 (IL-12)

IL-12 je heterodimer, sestavljen iz 35 kDa lahke verige in 40 kDa težke verige. Proizvedejo ga celice T in celice naravne ubijalke kot odgovor na prisotnost mikrobnega agensa. Ob vezavi IL-12 na receptor se aktivira JAK-STAT pot signalne transdukcijske in prepisovanja tarčnih genov. Povečana koncentracija IL-12 omogoča pozitivno povratno zanko, ki generira več celic T in celic naravnih ubijalk skupaj z drugimi imunoregulatornimi citokini, kot so IFN- $\gamma$ , IL-10 in TNF $\alpha$ . Čeprav je IL-12 pomemben začetnik celično posredovane imunosti, so njegovi vnetni učinki lahko škodljivi. Prekomerna produkcija tega citokina lahko privede do različnih avtoimunskeh motenj (Trinchieri, 2003).

Kokošji IL-12, sestavljen iz 315 aminokislin (zrela oblika tega polipeptida obsega 300 aminokislin), je homologen sesalskemu IL-12 in je v 46 % aminokislin identičen človeškemu IL-12. Tako kot pri sesalcih kokošji IL-12 stimulira produkcijo citotoksičnih celic T in celic naravnih ubijalk (Balu in Kaiser, 2003).

### 2.3.4 Interlevkin-18 (IL-18)

Citokin IL-18 je pri sesalcih sintetiziran kot biološko neaktivni prekurzorski protein z molekulsko maso 22,3 kDa. Aktivna oblika proteina z molekulsko maso 18,3 kDa nastane ob cepitvi prekurzorja s kaspazo 1. IL-18 sintetizirajo monociti in makrofagi med akutnim imunskim odzivom. Njegova funkcija je spodbujanje oziroma indukcija proizvodnje IFN $\gamma$  in celic T pomagalk (CD4). Deluje kot rastni in diferenciacijski faktor za celice T CD4. Regulira citotoksično aktivnost celic naravnih ubijalk, posredovano zligandom FAS. IL-18 je del kompleksnega regulatornega sistema, ki je vpletен pri programirani celični smrti ali apoptozi (Okamura in sod., 1995).

cDNK, ki kodira IL-18 pri kokoših, ima 30-odstotno identičnost sekvence s sesalskim IL-18. Protein je sestavljen iz 198 aminokislin. Po cepitvi proteina na mestu 29 nastane zrela oblika proteina, ki jo sestavlja 169 aminokislin (Schneider in sod., 2000).

### 2.3.5 Interlevkin-2 (IL-2)

Sesalski IL-2 je glikoprotein z molekulsko maso 15,5 kDa, ki ga producirajo T celice pomagalke (CD4). Njegovo izločanje je stimulirano ob vezavi antigena na T celični receptor (TCR). Ob predstavljivosti antigena se izrazi tudi receptor za IL-2, ki je multimolekularni kompleks, sestavljen iz α, β in γ podenote. Vezava IL-2 na receptor privede do fosforilacije in prenosa signala po JAK-STAT poti. Tako kot v primeru signalizacije pri IL-6 ob fosforilaciji pride do aktivacije signalne transdukcijske in aktivacije transkripcije (STAT) proteinov. Ti proteini stimulirajo rast, diferenciacijo in preživetje

antigen specifičnih citotoksičnih limfocitov T in tako ob prisotni okužbi povečajo število CD4 celic. IL-2 je nujen za razvoj imunološkega spomina celic T, kar je unikatna karakteristika imunskega sistema (Gaffen in sod., 1988).

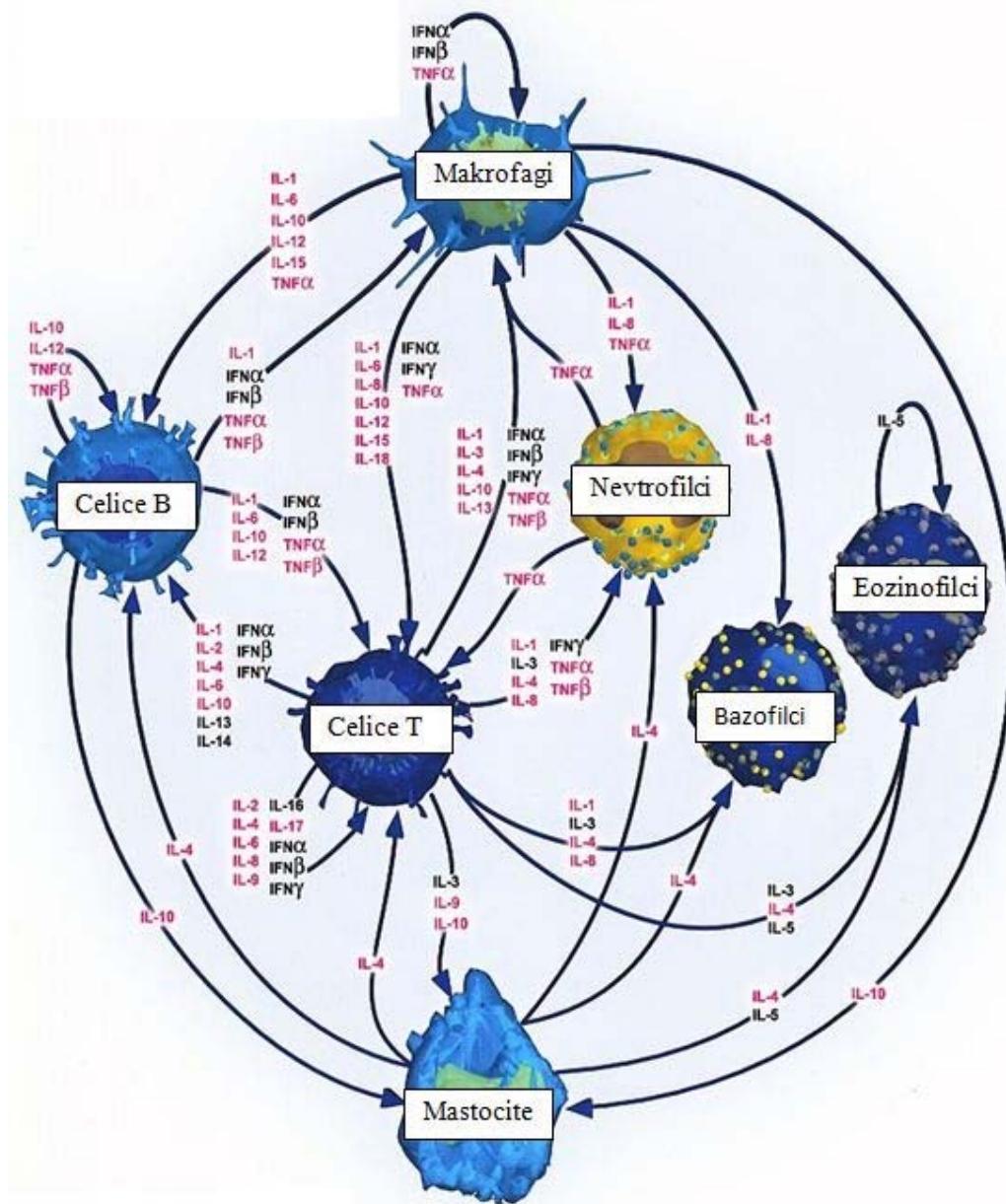
Kokošji IL-2 je skoraj identičen sesalskemu IL-2. Zrela oblika proteina obsega 121 aminokislin in ima v »in vitro« pogojih molekulsko maso 14,2 kDa. Tako kot pri sesalcih za bio-aktivnost IL-2 ni potrebna glikozilacija (Sundick in Gill-Dixon, 1997; Stepaniak in sod., 1999).

### 2.3.6 Interferoni (IFN)

Interferoni so celične beljakovine, ki jih proizvajajo in izločajo limfociti ob prisotnosti patogenov, kot so bakterije, virusi ali paraziti. Ime so dobili po sposobnosti, da zavirajo (»interferirajo«) virusno podvojevanje v gostiteljski celici. Sintetizirajo se že nekaj ur po vdoru virusov ali bakterij v organizem in preprečujejo njihovo razmnoževanje. Znane so tri vrste interferonov, ki se razlikujejo po fizikalnih, kemičnih in bioloških lastnostih: levkocitini ( $\text{IFN}\alpha$ ), fibroblastni interferoni ( $\text{IFN}\beta$ ) in imunski interferoni ( $\text{IFN}\gamma$ ). Sinteza različnih vrst interferonov je odvisna od spodbujevalcev in od celic, ki izdelujejo interferone. Pod vplivom virusov nastane v levkocitih in številnih drugih celicah  $\text{IFN}\alpha$ , v fibroblastih in epitelijskih celicah pa  $\text{IFN}\beta$ .  $\text{IFN}\gamma$  izdelujejo limfociti po spodbujanju z mitogeni ali ob ponovnem stiku z antigeni. Molekulska masa  $\text{IFN}\alpha$  in  $\text{IFN}\beta$  je približno 20 kDa, molekulska masa  $\text{IFN}\gamma$  pa približno 17 kDa. Vse tri interferonske vrste, še posebej  $\text{IFN}\gamma$ , na različne načine vplivajo na imunski odziv.  $\text{IFN}\alpha$  in  $\text{IFN}\beta$  spodbujata ali zavirata izdelovanje protiteles.  $\text{IFN}\gamma$  povzroči zorenje mirujočih limfocitov B v plazmatke, ki izdelujejo velike količine protiteles. Vse tri interferonske vrste spodbujajo fagocitno dejavnost krvnih monocitov in tkivnih makrofagov, tako da povečajo oksidativno presnovo, sproščanje lizosomskih proteolitičnih encimov in izdelovanje dušikovih intermediatov (NO).  $\text{IFN}\alpha$  in  $\text{IFN}\gamma$  povzročata zorenje razvojnih predstopenj celic NK in pospešujejo citolitično dejavnost zrelih celic NK. Celice NK tudi same izločajo interferone (predvsem  $\text{IFN}\gamma$ ) ob stiku z okuženimi celicami. Nastane pozitivna povratna zveza, ki povzroči zorenje nezrelih celic v zrele celice NK in njihovo okrepljeno delovanje. Celice NK razkrajajo tarčne celice brez predhodne antigenske predstavitev. Poleg tega interferoni pospešujejo delitev in povečujejo dejavnost citotoksičnih limfocitov T, ki uničujejo okužene celice, kadar na njihovi površini prepoznajo virusne ali mikrobne antigene in antigene poglavitnega histokompaktibilnostnega razreda I (MHC I).  $\text{IFN}\alpha$  okrepi proliferacijo spominskih limfocitov T in med občasnimi okužbami pomaga obnavljati in vzdrževati imunski spomin. Interferoni povzročijo, da se na površini fagocitnih celic poveča izražanje receptorjev za Fc del protiteles (FcR). Fagociti zato lažje požirajo okužene celice, na katere so se vezala protitelesa. Vse tri interferonske vrste tudi spodbujajo izražanje genov z zapisi za površinske antigene MHC I.  $\text{IFN}\gamma$  spodbuja še izražanje antigenov MHC II. Posledica povečanja števila antigenov MHC I na površini

okuženih celic je, da citotoksični limfociti T lažje prepoznajo in uničijo tarčne celice. Posledica povečanja sinteze antigenov MHC II v makrofagih je okrepljena predstavitev virusnih ali mikrobnih antigenov celicam T CD4, ki usmerjajo imunski odziv. Pri celičnem imunskejem odzivu celice T CD4 izločajo IL-2, IL-4 in IL-6, ki spodbujajo delitev in zorenje citotoksičnih limfocitov T. Interferoni, zlasti IFN $\gamma$ , lahko sprožijo izdelovanje različnih citokinov, ki sami ali v sodelovanju z interferoni povečajo imunski odziv. Tako IFN $\gamma$  spodbuja makrofage k izdelovanju TNF, ki povečuje fagocitno dejavnost monocitov in makrofagov. Hkrati IFN $\gamma$  sam ali ob pomoči IL-1 spodbuja izdelovanje in izločanje IL-2 ter receptorjev za IL-2. IL-2 pospešuje delitev citotoksičnih limfocitov T in celic NK ter povečuje njihovo učinkovanje na okužene celice. Sinergistično delovanje IFN $\gamma$ , TNF in IL-2 na različne imunske celice ima tako pomembno vlogo pri odstranjevanju okuženih celic (Koren in sod., 2007; Abbas in Lichtman, 2006–2007; Goldsby in sod., 2000).

Kokošji IFN $\gamma$  sestavlja 164 aminokislin (19 aminokislin predstavlja signalni peptid, preostalih 145 aminokislin pa zrel protein). Človeški IFN $\gamma$  in kokošji IFN $\gamma$  imata 32 % identičnih aminokislin. Kokošji IFN $\gamma$  ima molekulsko maso 16,8 kDa in dve potencialni N-glikozilacijski mesti. Geni, ki kodirajo kokošji IFN $\gamma$ , se nahajajo na kokošjem kromosomu 1 in imajo podobno organizacijo kot njegov človeški ekvivalent (ena kopija genov s podobno strukturo intronov in eksonov) (Kaiser in sod., 1998). IFN $\alpha$  pri kokoših sestavlja 193 aminokislin, od katerih je 24 % identičnih s sesalskim IFN $\alpha$  (Sekellick in sod., 1994).



Slika 3: Sinergistično delovanje vnetnih citokinov ob prisotnosti virusne ali bakterijske okužbe. Ob okužbi se aktivirajo različne vnetne celice (prikazane na sliki), ki pospešeno odstranjujejo organizmu lastne okužene celice in hkrati preprečujejo širjenje vnetja (ABCAM®, 2011).

Preglednica 1: Pregled poglavitnih citokinov pri pticah, celic, ki te citokine proizvajajo in funkcij, ki jih citokini opravljajo v organizmu ob prisotni okužbi (McInnes in Schett, 2007; Goldsby in sod., 2000).

Citokin	Proizvajajoča celica	Funkcija v organizmu
<b>Interlevkin-1 beta</b>	Monociti, sinovialni fibroblasti, limfociti B, hondrociti, dendritične celice	Aktivacija makrofagov in limfocitov T (producija drugih citokinov in kemokinov); povišanje telesne temperature
<b>Interlevkin-2</b>	Limfociti T (CD4)	Stimulirajo rast, diferenciacijo in preživetje antigen specifičnih citotoksičnih limfocitov T; povečajo število CD4 celic
<b>Interlevkin-6</b>	Monociti, makrofagi, sinovialni fibroblasti, limfociti B, limfociti T	Zorenje in diferenciacija limfocitov B in produkcija protiteles; hematopoeza in trombopoeza; zorenje limfocitov T, njihova diferenciacija in citotoksičnost; povečanje nevroendokrinih učinkov
<b>Interlevkin-12</b>	Makrofagi, celice B, celice T, celice NK	Zorenje in diferenciacija celic T pomagalk; citotoksičnost celic T in celic NK; aktivacija celic B
<b>Interlevkin-18</b>	Monociti, makrofagi	Diferenciacija celic T, aktivacija celic NK (sproščanje citokinov in citotoksičnost), sproščanje citokinov iz monocitov, indukcija proizvodnje IFN $\gamma$
<b>Interferon alfa</b>	Levkociti	Spodbuja ali zavira izdelovanje protiteles; dejavnost fagocitov, citotoksičnih limfocitov T in celic NK; izražanje receptorjev (FcR) in antigenov MHC na površini celic; izdelovanje citokinov (interlevkinov, TNF)
<b>Interferon gama</b>	Limfociti	Zorenje mirujočih limfocitov B v plazmatke; dejavnost fagocitov, citotoksičnih limfocitov T in celic NK; izražanje receptorjev (FcR) in antigenov MHC na površini celic; izdelovanje citokinov (interlevkinov, TNF)

### 2.3.7 Citokini pri artritičnih procesih

Revmatoidni artritis (RA) je kronična avtoimunska bolezen. Označuje jo kronično vnetje sklepov, ki pogosto privede do uničenja hrustanca in kosti. Razlog za pojav revmatoidnega artritisa je prekomerna produkcija nekaterih citokinov, ki delujejo kot posredniki vnetja in so direktno odgovorni za pojav določenih simptomov, uničenje sklepov in neustrezzo zaustavljanje nekaterih citokinov, ki delujejo protivnetno. Revmatoidni sklepi izkazujejo neravnovesje med aktivnostjo vnetnih in protivnetnih citokinov. Vnetni citokini, kot so IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 in IL-23, igrajo ključno vlogo v patogenezi artritisa, saj povečajo produkcijo citokinov, kemokinov in razgradnih encimov. Klinične študije so pokazale, da se pri zdravljenju bolezni revmatoidnega artritisa z zavralci TNF bolezen ne ozdravi pri večini bolnikov. To nakazuje, da so pri vnetno citokinski kaskadi prisotni še drugi citokini ali dejavniki. Med te prištevamo tudi citokin IL-17, ki ga proizvajajo celice T pomagalke (celice Th17). IL-17 inducira produkcijo vnetnih mediatorjev, kot so TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  in IL-6, iz različnih celic sklepov, med katere prištevamo sinovialne fibroblaste, makrofage in hondrocite. IL-17 lahko tudi neposredno vpliva na poškodbe hrustanca in erozijo kosti. Avrămescu in sodelavci so testirali sinovialne tekočine 37 pacientov, ki so imeli revmatoidni artritis. Dokazali so, da se z napredovanjem bolezni povečuje vsebnost vnetnih citokinov in zmanjšuje vsebnost protivnetnih citokinov, kar posledično privede do širjenja vnetja in napredovanja bolezni revmatoidnega artritisa (Avrămescu in sod., 2005; Monari in sod., 2009).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 SEROLOŠKE ANALIZE

Domnevno okužene kokoši, ki so kazale klinične znake okužbe z bakterijo *Mycoplasma synoviae*, so iz različnih farm v okolini Padove žrtvovali in testirali na prisotnost bakterije. V serumih in sinovialnih tekočinah so dokazovali prisotnost protiteles proti bakteriji *Mycoplasma synoviae*. V trahejah, sklepih in oviduktih so dokazovali prisotnost žive bakterije. Za dokaz prisotnosti bakterije oziroma njene deoksiribonukleinske kisline (DNK) so uporabili tudi verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Rezultati izvedenih seroloških testov so prikazani v preglednici 6. Po potrjeni okužbi smo pridobili vzorce sinovialne tekočine, v katerih smo žeeli dokazati prisotnost različnih citokinov (preglednica 1).

#### 3.2 POSREDNI IMUNOENCIMSKI TEST (DIBA)

DIBA (angl. »dot immunobinding assay«) je test, ki temelji na adsorbciji proteinov na nitrocelulozno membrano in njihovi detekciji z uporabo specifičnih protiteles. Za izvedbo testa potrebujemo primarna protitelesa, ki se vežejo na membransko vezane proteine, encimsko označena sekundarna protitelesa, ki se vežejo na primarna protitelesa, ter substrat, ki da barvno reakcijo ob encimski razgradnji. Glede na intenziteto barve lahko ocenimo koncentracijo tarčne molekule (Sumi in sod., 2009).

Preglednica 2: Primarna zajčja in mišja protitelesa, ki smo jih uporabili pri izvedbi posrednega imunoencimskega testa (DIBA) in redčitve v 0,05-odstotni Tween PBS.

Vir protiteles	specifika protiteles	referenca	Redčitev
Zajčja	kokošji IL-1 beta	ni reference	1:100
Zajčja	kokošji IL-6	ni reference	1:100
Zajčja	kokošji IL-18	ni reference	1:100
Zajčja	kokošji IFN $\alpha$	ni reference	1:100
Zajčja	kokošji IFN $\gamma$	ni reference	1:100
Mišja	kokošji IL-2	(Rothwell in sod., 2001)	1:100
Mišja	kokošji IL-12	(Balu in sod., 2011)	1:100

Test smo izvedli podobno, kot je opisan v literaturi (Benčina in sod., 2000). Na nitrocelulozno membrano (Immobilon Transfer Membrane, MILIPORE) smo rahlo narisali kvadratke velikosti 5 x 5 mm in membrano prenesli v 100-odstotni metanol za 1 do 2 sekundi. S tem so se aktivirala vezavna mesta. Membrano smo nato sprali v destilirani vodi (1–2 minuti) in posušili. Ko se je membrana posušila, smo v kvadratke nanesli po 3  $\mu$ l vzorcev sinovialne tekočine kokoši in pustili, da so se posušili. Vsak vzorec sinovialne

tekočine (skupaj 18 vzorcev) smo testirali na prisotnost različnih citokinov (IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-18, IFN $\alpha$  in IFN $\beta$ ) in za vsak citokin naredili po tri ponovitve. Membrano smo nato prenesli v 0,5-odstotno Tween PBS (pufer za blokado). S tem smo zapolnili aktivna mesta na membrani z nespecifičnim proteinom in preprečili možno vezavo drugih proteinov. Po 30 minutah smo membrano vzeli iz pufra za blokado, jo razrezali na ustrezne trakove, te položili v raztopine ustreznih protiteles (preglednica 2) in eno uro inkubirali pri sobni temperaturi. Trakove membrane smo nato spirali trikrat po 10 minut v 0,05-odstotni TPBS. Sledila je 40-minutna inkubacija s sekundarnimi protitelesi, ki so bila v primerih IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, IFN $\alpha$  in IFN $\gamma$  kozja protitelesa proti zajčjim IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Sigma), ki smo jih redčili 1:1000 z 0,05-odstotno Tween PBS, ali zajčja protitelesa proti mišjim IgG (v primeru IL-2 in IL-12), konjugirana s hrenovo peroksidazo (Sigma), ki smo jih redčili 1:500 z 0,05-odstotno Tween PBS. Ponovno smo spirali trikrat po 10 minut v 0,05-odstotni Tween PBS in posušili do stopnje, ko je bilo potrebno dodati substrat TrueBlue (Kirkegaard & Perry Laboratories, ZDA). Po dodatku substrata smo počakali, ali se bo razvila modra barva, in pravočasno ustavili reakcijo s prenosom v destilirano vodo.

### 3.3 SDS-PAGE ELEKTROFOREZA

Uporabili smo gelsko elektroforezo, metodo, ki se uporablja za ločevanje ali identifikacijo proteinov. Ker smo želeli s to metodo ločiti proteine različnih oblik in velikosti, jih je bilo potrebno najprej denaturirati, tako da proteini niso imeli več sekundarne, terciarne ali kvarterne strukture, temveč le primarno. S pomočjo natrijevega dodecil sulfata (SDS) smo denaturirali vse proteine do linearne oblike. Tako so se vsi proteini ločili le glede na polipeptidno dolžino (Schägger in Jagow, 1987).

#### 3.3.1 Priprava vzorcev

18 vzorcev sinovialne tekočine okuženih kokoši smo najprej redčili do primerne viskoznosti (preglednica 3). 50  $\mu$ l tako pripravljenih vzorcev smo dodali še 2,8  $\mu$ l DTT (Dithiothreitol; RD Systems) in nanašalni pufer (Loading buffer, Fermentas). DTT reducira in preprečuje nastanek disulfidnih vezi med proteini, nanašalni pufer pa služi za boljši pregled nad potekom elektroforeze, ker vsebuje modro obarvane proteine z majhno molekulsko maso, ki potujejo pred iskanimi proteini. Vse skupaj smo nato za dve minuti prenesli v vrelo vodno kopel. Tako so se reagenti premešali in proteini še dodatno denaturirali.

Preglednica 3: Pregled vzorcev sinovialnih tekočin okuženih kokoši in uporabljene redčitve.

Vzorec	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Redčitev	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:30	1:10	1:10	1:30
Vzorec	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Redčitev	1:10	1:10	1:30	1:10	1:3	1:10	1:10	1:10	1:10

### 3.3.2 Priprava gelov

Za uspešno ločitev proteinov in izvedbo elektroforeze smo uporabili dva zaporedna gela. Zgornji del gela (tako imenovani zbiralni gel) je rahlo kisel (pH 6,8) in ima nizko koncentracijo akrilamida (5 %), kar naredi gel porozen in manj zamrežen. Pod takšnimi pogoji se proteini slabo ločijo, vendar tvorijo tanek in jasno definiran pas. Spodnji del gela (tako imenovani ločitveni gel) je bolj bazičen (pH 8,8) in ima višjo koncentracijo akrilamida (v našem primeru 15 %), kar povzroči, da nastanejo majhni kanali in pore. Ozke pore (bolj zamrežen gel) imajo učinek presajanja, saj manjši proteini prehajajo skozi gel mnogo lažje in hitreje kot večji proteini.

Preglednica 4: Reagenti, ki so potrebni za pripravo 15 ml 15-odstotnega ločitvenega gela.

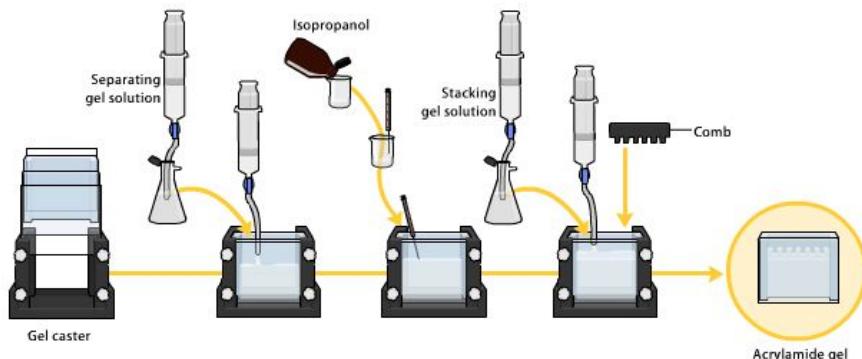
15-odstotni gel	15 ml
Voda ( $H_2O$ )	3,5 ml
30-odstotna mešanica Bisakrilamid	7,5 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,8 ml
10-odstotni SDS (natrijev dodecil sulfat)	0,15 ml
10-odstotni APS (amonijev persulfat)	0,15 ml
TEMED (tetrametiletilen-diamin, Sigma)	0,006 ml

Preglednica 5: Reagenti, ki so potrebni za pripravo 5 ml 5-odstotnega nabijjalnega gela.

5-odstotni gel	5 ml
Voda ( $H_2O$ )	2,8 ml
30-odstotna mešanica Bisakrilamid	0,83 ml
1,5 M Tris (pH 6,8)	0,63 ml
10-odstotni SDS (natrijev dodecil sulfat)	0,05 ml
10-odstotni APS (amonijev persulfat)	0,05 ml
TEMED (tetrametiletilen-diamin, Sigma)	0,005 ml

Vse reagente smo dodajali v vrstnem redu, kot so napisani v preglednicah 4 in 5. Zadnji reagent (TEMED) smo vedno dodali na koncu, pred vlivanjem gela v predhodno pripravljen nastavek, saj ta reagent povzroči strjevanje gela. Da se gel ni izsušil med strjevanjem, smo vrhnji del prvega sloja (15-odstotni gel) zalili z mešanico butanola in

vode v razmerju 1:1. Ko se je gel strdil (od 20 do 40 minut), smo mešanico odlili, sprali z vodo in pričeli z vlivanjem drugega sloja (5-odstotni gel). Še preden se je drugi sloj strdil, smo v zgornji del gela pritrdirli glavnik (Comb, Spineless, 15 well), da smo pripravili luknje za nanos vzorcev.



Slika 4: Postopek priprave zbiralnega in ločitvenega gela za izvedbo elektroforeze (SDS-PAGE Acrylamide gel, 2009).

### 3.3.3 Elektroforeza

Preglednica 6: Reagenti, ki so potrebni za pripravo 1 L 10 x koncentriranega elektroforeznega pufera.

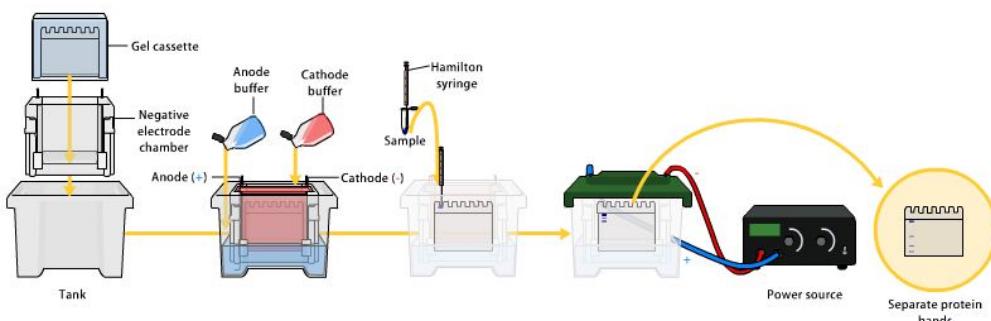
<b>10 x koncentriran elektroforezni pufer</b>	<b>1 L</b>
Trizma base	30,3 g
Glicin	144 g
1-odstotni SDS (natrijev dodecil sulfat)	10 g
destilirana voda	dopolnimo do 1 L

Preglednica 7: Reagenti, ki so potrebni za pripravo 1 L 1 x koncentriranega elektroforeznega pufera.

<b>1 x koncentriran elektroforezni pufer</b>	<b>1 L</b>
10 x koncentriran elektroforezni pufer	100 ml
destilirana voda	900 ml

Dva tako pripravljena in strjena gela smo prenesli v elektroforezno banjico in ju s ščipalkami pritrdirli na elektroforetsko napravo. V banjico smo nato nalili 1 x koncentriran elektroforezni pufer (preglednica 7), tako da sta bila gela ves čas v vlažnem okolju. Odstranili smo glavnike in začeli nanašati pripravljene vzorce z injekcijo Hamilton. Na voljo smo imeli 15 luknenj. V prvo luknjo smo nanesli 5 µl označevalca molekulskih mas (prestain protein loader; Fermentas), ki je vseboval proteine različnih molekulskih mas. Ti proteini so vidni brez barvanja in omogočajo boljše ovrednotenje rezultatov, hkrati pa lahko določimo molekulsko maso iskanih proteinov. V ostalih 14 luknenj smo nanesli po 30 µl pripravljenih vzorcev. Elektroforezno banjico smo nato pokrili s pokrovom ter priključili na vir napetosti. Elektroforeza je od 20 do 30 minut potekala pri konstantni

napetosti 100 V (voltov), da so vzorci prišli preko zbiralnega gela, nato pa smo povečali napetost na 130 V za dve uri, oziroma dokler ni vidna črta modro obarvanih proteinov z nizko molekulsko maso, ki smo jih dodali vzorcem, prišla do konca gela. Elektroforezno enoto smo nato razstavili in gele pripravili za prenos proteinov na membrano.



Slika 5: Slikovni prikaz izvedbe SDS-PAGE elektroforeze (SDS-PAGE Electrophoresis, 2009).

### 3.3.4 Prenos proteinov na membrano (»western blot«)

Preglednica 8: Reagenti, ki so potrebni za pripravo 1 L 10 x pufra CAPS.

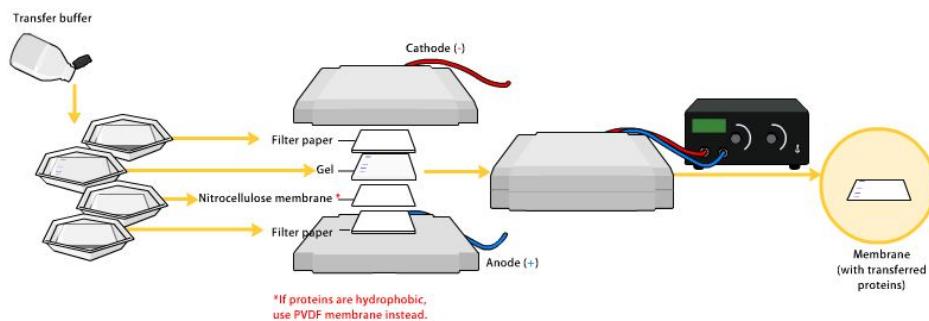
<b>10 x CAPS (pH 11)</b>	<b>1 L</b>
CAPS	22,13 g
destilirana voda	900 ml
2M NaOH	20 ml

Preglednica 9: Reagenti, ki so potrebni za pripravo 1 L pufra za prenos.

<b>Pufer za prenos</b>	<b>1 L</b>
10 x CAPS	100 ml
100-odstotni metanol	100 ml
destilirana voda	800 ml

Vsek gel smo po končani elektroforezi izmerili, da smo lahko pripravili filter papir (Electrode paper, GE Healthcare) in membrano (Immobilon Transfer Membrane, MILIPORE) enake velikosti. Gel smo nato previdno odstranili iz nastavka in s skalpelom odrezali zgornji del (zbiralni gel), nato pa ga za 5 minut prenesli v pufer za prenos (EBP – elektroblotting pufer) (preglednica 9). Na anodno ploščo smo najprej nanesli 4 filter papirje, ki smo jih omočili v pufru EBP, in s pipeto odstranili zračne mehurčke, ki so se naredili. Sledil je nanos membrane, ki smo jo predhodno aktivirali v 100-odstotnem metanolu (6 sekund) in nekaj sekund spirali v pufru EBP. Po petih minutah smo iz pufra EBP vzeli gel, ga položili na membrano in pokrili še s štirimi filter papirji. Na vsaki stopnji smo s pipeto odstranili zračne mehurčke, če so nastali. Vse skupaj smo pokrili s katodnim pokrovom in napravo priključili na vir napetosti. Glede na izmerjeno velikost gela smo izračunali

njegovo površino in nastavili konstantno vrednost električnega toka glede na površino. Vrednost smo izračunali za vsako membrano posebej, in sicer tako, da je bila vrednost električnega toka  $0,8 \text{ mA/cm}^2$ . Prenos je trajal 40 minut, ker je bil to optimalni čas za prenos proteinov z molekulsko maso od 10 do 43 kDa iz gela na membrano. Po končanem prenosu smo napravo za prenos razstavili, odstranili gel in filter papirje, membrano pa posušili in shranili do nadaljnje uporabe.



Slika 6: Potek prenosa proteinov iz gela na membrano (Western blot transfer, 2009).

### 3.3.5 Barvanje proteinov z barvilo Coomassie Blue

Da smo se prepričali, ali so proteini, ki smo jih iskali, res v našem vzorcu in če so se uspešno prenesli iz gela na membrano, smo en gel in eno membrano po prenosu (»western blot«) pobarvali z barvilo Coomassie Blue. Barvila Coomassie Blue imajo lastnost, da se vežejo na proteine preko ionskih interakcij med skupinami sulfonske kisline barvila in pozitivnimi aminskimi skupinami proteinov kot tudi preko Van der Waalsovih interakcij. Z vezavo povzročijo temno modro obarvanje proteinov. Hkrati se obarva tudi gel ali membrana, ki jo barvamo, zato je potrebno tudi razbarvanje, za kar se uporablja raztopina ocetne kisline.

#### 3.3.5.1 Barvanje gela

Za obarvanje proteinov na gelu smo pripravili raztopino metanola (225 ml) in dvojne destilirane vode (ddH<sub>2</sub>O) (225 ml) ter zraven dodali 0,5 grama barvila Coomassie Blue. Tik pred uporabo smo barvilo dodali še 50 ml ocetne kisline do 10 % končne koncentracije. V tako pripravljenem barvili smo barvali gel dve uri. Barvilo smo nato shranili, gel pa prenesli v raztopino za razbarvanje.

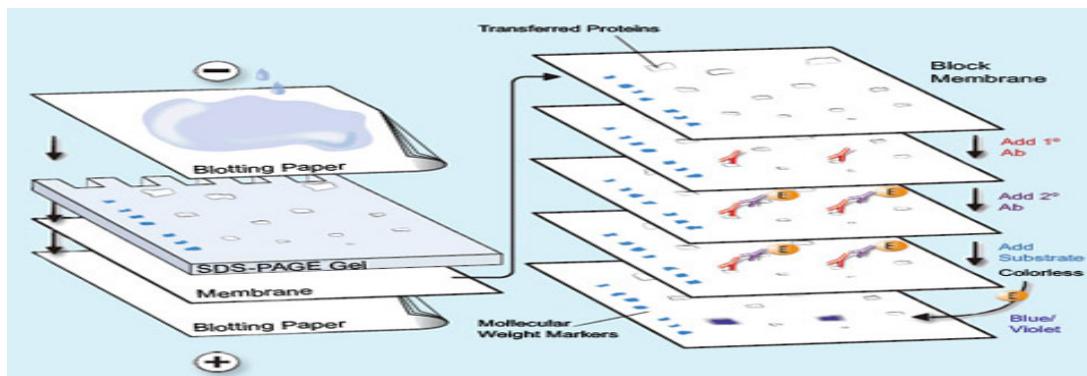
Za pripravo raztopine za razbarvanje barvila Coomassie Blue smo zamešali 25 ml metanola in 437,5 ml ddH<sub>2</sub>O. Tik pred uporabo smo dodali še 37,5 ml ocetne kisline do 7,5 % končne koncentracije. Razbarvanje je potekalo nekaj ur, dokler ni bilo vidne razlike med barvo gela in obarvanimi proteini (ozioroma če proteinov ni bilo, do razbarvanja gela). Raztopino za razbarvanje smo večkrat zamenjali, da je razbarvanje potekalo hitreje.

### 3.3.5.2 Barvanje membrane

Zaobarvanje proteinov na membrani so bili potrebeni manjši volumni metanola in ddH<sub>2</sub>O. Tako smo zamešali 50 ml metanola s 50 ml ddH<sub>2</sub>O in dodali 0,1 gram barvila Coomassie Blue. V tako pripravljenem barvilu smo inkubirali membrano s prenesenimi proteini tri minute, nato pa odstranili barvilo in pričeli z razbarvanjem po istem postopku, kot je potekalo razbarvanje gela.

### 3.3.6 Detekcija citokinov na nitrocelulozni membrani

Detekcija proteinov s specifičnimi protitelesi na nitrocelulozni membrani je potekala po podobnem postopku, kot je potekal posredni encimskoimunski test na membrani (DIBA). Posušeno membrano s prenesenimi proteini smo najprej aktivirali v 100-odstotnem metanolu (od 5 do 7 sekund). Da ni prišlo do nespecifične vezave primarnih ali sekundarnih protiteles, smo membrano za 40 minut prenesli v 0,5-odstotno Tween PBS, da so se blokirala prosta vezavna mesta. Nato smo jo eno uro inkubirali v primarnih protitelesih (preglednica 2) pri sobni temperaturi ob stalnem rahlem stresanju. Sledilo je trikratno spiranje po 10 minut z 0,05-odstotno Tween PBS. S tem smo odstranili nevezana protitelesa in se izognili lažno pozitivni reakciji. Membrano smo nato še 40 minut inkubirali v sekundarnih protitelesih – v kozjih protitelesih proti zajčjim IgG, konjugiranih s hrenovo peroksidazo (Sigma), ki smo jih redčili 1:1000 z 0,05-odstotno Tween PBS, ter v zajčjih protitelesih proti mišjim IgG, konjugiranim s hrenovo peroksidazo (Sigma), ki smo jih redčili 1:500 z 0,05-odstotno Tween PBS. Ponovno sta sledila trikratno spiranje po 10 minut z 0,05-odstotno Tween PBS in sušenje membrane do stopnje, ko je bilo potrebno dodati substrat. V tem primeru smo namesto TrueBlue uporabili bolj specifičen substrat (Novex HRP Chromogenic Substrate (TMB), Invitrogen). Po razvoju barve smo reakcijo ustavili s prenosom membrane v destilirano vodo.



Slika 7: Potek detekcije proteinov na nitrocelulozni membrani s primarnimi in sekundarnimi protitelesi po elektroforezi in prenosu proteinov iz gela na membrano (Komabiotech, 2008).

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI SEROLOŠKIH ANALIZ

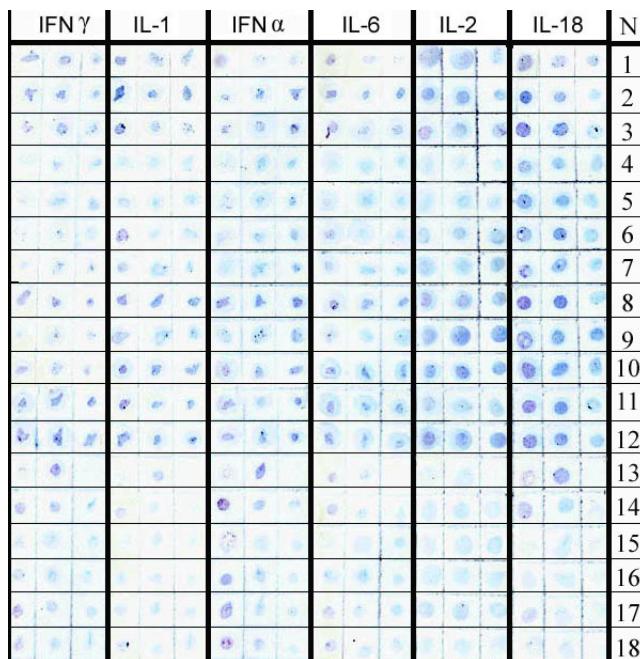
Preglednica 10: Pregled rezultatov seroloških analiz, izolacije in PCR reakcije z bakterijo *Mycoplasma synoviae* okuženih kokoši.

Št. vzorca	Lokalna protitelesa proti MS v sinovialni tekočini	Protitelesa proti MS v serumu	Izolacija žive MS iz trahej (T), sklepov (S), oviduktov (O)	PCR MS (bris trahej)
1	+	+	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	T	+
4	+	+	-	-
5	+	+	T	+
6	+	+	T	+
7	+	+	T	+
8	+	+	T	+
9	+	+	-	-
10	+	+	-	+
11	+	+	T	+
12	+	+	T	+
13	+	+	T	+
14	+	+	T	+
15	+	+	T, O	+ (tudi ovidukt)
16	+	+	T	+
17	+	+	T	+
18	+	+	T	+

Serološke analize, ki so bile opravljene na vzorcih iz kokoši, ki so kazale klinične znake okužbe z bakterijo *Mycoplasma synoviae* (MS), so pokazale, da so bila lokalna protitelesa proti bakteriji *Mycoplasma synoviae* prisotna tako v sinovialnih tekočinah kot tudi v serumu pri vseh osemajstih okuženih kokoših. Z nadaljnimi raziskavami so žeeli izolirati živo bakterijo *Mycoplasma synoviae* iz trahej (T), sklepov (S) in oviduktov (O). Rezultati izolacije so potrdili prisotnost žive bakterije v večini vzorcev, predvsem v trahejah (pri vzorcu 15 tudi v oviduktu), razen pri vzorcih št. 1, 2, 4, 9 in 10. Za potrditev bakterijske vrste *Mycoplasma synoviae* so izvedli še verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Vzorce so pridobili z brisom trahej, saj so bile te najbolj izpostavljeni okužbi glede na rezultate izolacije. Rezultati reakcij PCR so bili pozitivni pri kokoših, v katerih so potrdili tudi prisotnost žive bakterije. Pozitiven je bil tudi vzorec št. 10. Glede na dobljene rezultate

lahko sklepamo, da gre pri vzorcih št. 1, 2, 4 in 9 za staro okužbo, kjer je imunski sistem kokoši že odstranil žive bakterije *Mycoplasma synoviae*, ostali pa so morda še kompleksi antigen-protitelo, ki še aktivirajo celice B k produkciji specifičnih protiteles. Pri vzorcu št. 10 je možno, da je imunski sistem kokoši uničil večino živih bakterij, ostala pa je DNK bakterije, kar je privedlo do pozitivne PCR reakcije.

#### 4.2 REZULTATI POSREDNEGA IMUNOENCIMSKEGA TESTA (DIBA)

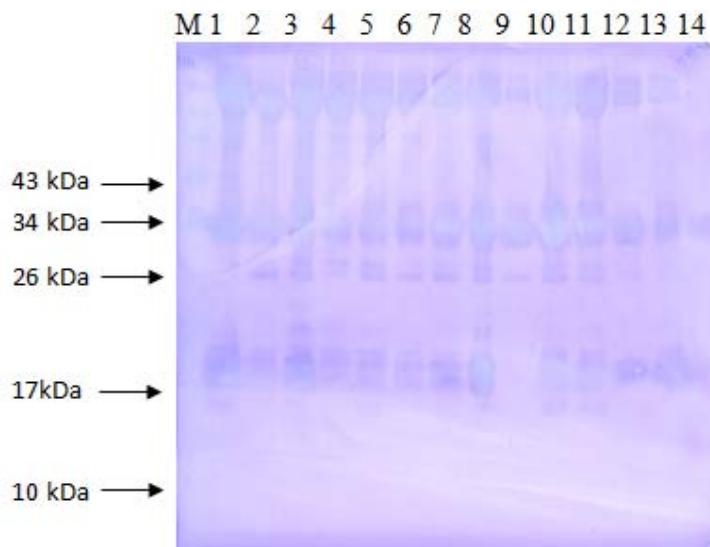


Slika 8: Prikaz združenih membran posrednega encimskoimunskega testa (DIBA), s katerim smo dokazovali prisotnost določenih citokinov v različnih vzorcih sinovialnih tekočin kokoši (označenih na vrhu slike). Njihova vsebnost je sorazmerna z intenziteto modro-vijolične barve. Imeli smo 18 vzorcev, ki so označeni na sliki s številkami od 1 do 18 v stolpcu z oznako N (štetilo, angl. number). Številke vzorcev na sliki 8 se ujemajo s številkami vzorcev v preglednici 6.

Na sliki 8 lahko vidimo rezultate posrednega imunoencimskega testa (DIBA), s katerim smo testirali prisotnost različnih citokinov v sinovialnih tekočinah. Vsebnost posameznega citokina je sorazmerna z intenziteto modro-vijolične barve. Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da so se pri vseh testiranih kokoših v sinovialnih tekočinah nahajali citokini. Njihova vsebnost je precej manjša pri vzorcih od 13 do 18 kot tudi pri vzorcih 4 in 5. Verjetno pri teh kokoših okužba še ni dovolj napredovala ali pa so imele kokoši oslabljen imunski sistem.

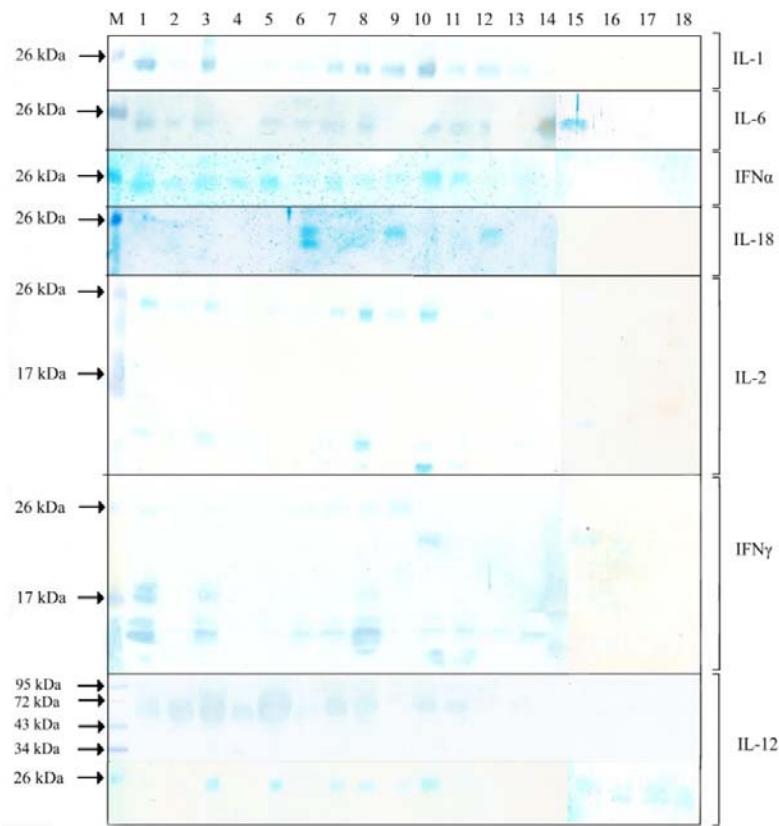
### 4.3 USPEŠNOST PRENOŠA PROTEINOV NA MEMBRANO

Da smo dobili zanesljivejše rezultate v smislu specifične reakcije med citokini in protitelesi, smo proteine med seboj ločili glede na njihovo molekulska maso z SDS-PAGE elektroforezo, jih prenesli na membrano in nato detektirali s pomočjo specifičnih primarnih protiteles. Po končani SDS-PAGE elektroforezi in prenosu proteinov smo najprej z barvilm Coomassie Blue barvali tako poliakrilamidni gel kot nitrocelulozno membrano, da smo ovrednotili uspešnost prenosa. Kot je razvidno iz slike 9, so se proteini uspešno prenesli po 40 minutah in konstantni vrednosti 107,5 mA. Po prenosu in barvanju z barvilm Coomassie Blue na poliakrilamidnem gelu ni ostalo nič proteinov (zaradi težavnosti skeniranja gela slika ni dodana).



Slika 9: Skenirana slika nitrocelulozne membrane po končanem prenosu (ki je trajal 40 minut pri konstantni vrednosti 107,5 mA) iz poliakrilamidnega gela in barvanju z barvilm Coomassie Blue. V prvi vrsti je bil dodan označevalec (prestain protein loader; Fermentas), označen s črko M, nato pa si po vrsti sledijo vzorci od 1 do 14. Na levi strani slike so označene molekulske mase proteinov v označevalcu.

#### 4.4 REZULTATI DETEKCIJ CITOkinOV NA MEMBRANAH



Slika 10: Prikaz rezultatov detekcije različnih citokinov na membranah. Vzorci sinovialnih tekočin so označeni s številkami od 1 do 18, M predstavlja marker (prestrain protein loader; Fermentas), ki smo ga uporabili za boljši pregled rezultatov in določitev molekulске mase iskanih citokinov, na desni strani so označeni posamezni citokini, na levi pa molekulsa masa proteinov v markerju.

Z opravljeno detekcijo vseh iskanih citokinov v vzorcih sinovialnih tekočin smo sestavili profil vseh zaznanih citokinov, ki je prikazan na sliki 8. Ker so bili volumni nanešenih vzorcev precej majhni ( $50 \mu\text{l}$ ), predhodno pa še redčeni (preglednica 3) zaradi visoke viskoznosti sinovialne tekočine, so bile koncentracije zaznanih citokinov precej nizke, kar je razvidno iz nizke intenzitete modro-vijolične barve. Vendar so se proteini dobro ločili in na sliki 10 je razvidno, pri katerih vzorcih so bili prisotni določeni citokini. Količine proteinov (citokinov) smo na podlagi intenzitete barve primerjalno ovrednotili in so prikazane na preglednici 11.

Preglednica 11: Prikaz vsebnosti posameznih citokinov v različnih vzorcih sinovialnih tekočin, označenih s številkami od 1 do 18, glede na intenziteto modro-vijolične barve s slike 10.

Vzorci	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-6	IL-12	IL-18	IFN- $\gamma$	IFN- $\alpha$
1	++	+	++	+	-	++	++
2	-	-	+	+	-	-	+
3	++	+	+	+	-	+	++
4	-	-	+	+	-	-	+
5	-	-	++	+	-	-	++
6	+	-	+	+	+++	+	+
7	+	+	+	+	-	+	+
8	+	++	+	+	-	++	+
9	+	+	+	+	+++	-	+
10	++	++	++	+	-	+	++
11	+	-	+	+	-	+	+
12	+	-	-	-	+++	+	-
13	+	-	-	-	-	+	-
14	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	++	+	-	+	-
16	-	-	-	+	-	-	-
17	-	-	-	+	-	-	-
18	-	-	-	+	-	-	-

Legenda: +++ visoka vsebnost citokinov

++ zmerna vsebnost citokinov

+ majhna vsebnost citokinov

- ni zaznanih citokinov

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Vse živali so med evolucijo razvile obrambne mehanizme, ki omogočajo zaščito pred potencialno nevarnimi patogeni. Evolucija imunskega sistema je tako najverjetnej posledica selekcijskega pritiska mikrobov na večcelične organizme (Beck in Habicht, 1994). Imunski sistem je sistem bioloških struktur in procesov v organizmu in je karakteriziran po sposobnosti, da razlikuje med lastnimi in tujimi celicami, tkivi ali molekulami. Njegova glavna funkcija v organizmu je, da pravočasno zazna mikrobe in jim onemogoči preživetje v gostitelju ter odstranjuje že prisotne okužbe (Abbas in Lichtman, 2006–2007). Imunski sistem lahko razdelimo na dva podsistema: prirojena imunost in pridobljena (specifična) imunost. Prirojeni imunski sistem je nespecifičen in se hitro odzove na prisotnost patogenega organizma, vendar njegovi učinki ne trajajo dolgo. Po drugi strani je pridobljeni imunski sistem bolj specifičen in posreduje močnejši imunski odgovor, vendar preteče več časa, preden se aktivira (Janeway in sod., 2001).

Bakterija *Mycoplasma synoviae* je patogena bakterija, ki je sposobna preiti skozi sinovialno membrano v sklepih, kjer povzroči kužni sinovitis ali vnetje ovojnici (Kleven, 2003). Vnetje je eden prvih odgovorov prirojenega imunskega sistema na prisotno okužbo (Kawai in Akira, 2006). Pri vnetju se pojavit rdečica in otekлина, kar je posledica povečanega dotoka krvi v tkivo in tvorbe vnetne tekočine. Poškodovane ali okužene celice proizvajajo eikozanoide in citokine, ki s svojim delovanjem povzročijo vnetno reakcijo. Eikozanoidi so derivati arhidonske kisline in vključujejo prostaglandine, ki povzročijo povišanje telesne temperature in razširitev krvnih žil, ter levkotriene, ki privablja bele krvne celice (levkocite) (Ogawa in Calhoun, 2006). Citokini so beljakovine z majhno molekulsko maso, ki sinergistično in antagonistično delujejo na krajše razdalje kot posredniki med elementi imunskega sistema (slika 3). Med citokine vključujemo interlevkine, ki so odgovorni za komunikacijo med belimi krvnimi celicami, kemokine, ki spodbujajo kemotakso, in interferone, ki imajo protivirusne učinke, kot je na primer zaustavitev proteinske sinteze v gostiteljski celici (Le in sod., 2004). Ti citokini privedejo imunske celice do mesta okužbe ter promovirajo odstranjevanje patogenov in okuženih celic (Martin in Leibovich, 2005).

Navadno v sinovialnih sklepih zdravih kokoši ni dovolj tekočine za odvzem vzorca. Če pa okužba dihalnega trakta, ki jo povzroča *Mycoplasma synoviae*, preide v sistemsko okužbo in se razvije kužni sinovitis, se v sklepih akumulira velika količina sinovialne tekočine. Spremenita se barva in viskoznost sinovialne tekočine, hkrati pa se poveča tudi koncentracija vnetnih celic. Vzorce, ki smo jih pridobili iz takšnih sklepov, smo najprej testirali s posrednim encimskoimunskim testom (DIBA) na prisotnost citokinov IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-18, IFN $\alpha$  in IFN $\gamma$ . Ker je ta metoda precej nezanesljiva, saj lahko pride do

navzkrižne reaktivnosti primarnih ali sekundarnih protiteles in posledično do lažno pozitivnih rezultatov, smo vzorce ločili še s pomočjo SDS-PAGE elektroforeze. Tako ločene proteine smo nato prenesli še na nitrocelulozno membrano in ponovno detektirali s pomočjo primarnih (preglednica 2) in s hrenovo peroksidazo konjugiranih sekundarnih protiteles.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo na potek oziroma stanje okužbe kokoši v času odvzema vzorca sinovialne tekočine. Kot smo pričakovali glede na rezultate posrednega encimskoimunskega testa (DIBA) (slika 8), je bilo najmanj oziroma nič citokinov zaznanih pri vzorcih, označenih s številkami od 13 do 18. Na sliki 8 lahko opazimo, da je bila pri teh vzorcih šibka reakcija citokinov in ustreznih protiteles, torej so citokini v nizkih koncentracijah. Serološki testi (preglednica 10) so pokazali tako prisotnost protiteles proti bakteriji *Mycoplasma synoviae* kot tudi živo bakterijo, zato lahko predpostavimo, da so bile testirane kokoši okužene z bakterijo *Mycoplasma synoviae*, vendar se imunski sistem kokoši ni odzval v polni moči. Možno je, da je bila okužba v začetnih stopnjah razvoja, ker vemo, da ta bakterija raste in se razmnožuje izjemno počasi, in ni predstavljala večje nevarnosti za organizem. Dokazano je bilo tudi, da bakterija *Mycoplasma synoviae* povzroča imunsko represijo, tako da vpliva na kokošji celični in humorali imunski sistem (Nascimento in sod., 2005). Ker so bili vzorci sinovialne tekočine pri posrednem imunoencimskem testu (DIBA) neredčeni, je možno, da smo zaznali manjše koncentracije citokinov (nizka intenziteta modro-vijolične barve), medtem ko so bili pri nadaljnjih poizkusih vzorci redčeni (preglednica 3). To je bil lahko razlog, da na nitrocelulozni membrani nismo zaznali nobenih citokinov.

Najvišjo koncentracijo vnetnih citokinov smo dokazali pri vzorcih št. 1, 3, 8 in 10. Pri teh vzorcih so bili prisotni vsi citokini razen IL-18. Pri detekciji IL-18 s posrednim imunoencimskim testom (DIBA) je najverjetnejše prišlo do navzkrižne reaktivnosti uporabljenih primarnih protiteles (zajčja protitelesa proti kokošjim IL-18 (prof. Kaspes, Nemčija)), saj so rezultati (pričazani na sliki 10) kljub upoštevani redčitvi pokazali prisotnost istega interlevkina le pri vzorcih št. 6, 9 in 12, medtem ko so bili pri posrednem imunoencimskem testu (DIBA) vsi vzorci močno pozitivni.

Levkocitni IFN $\alpha$  in IL-6 sta bila prisotna pri večini testiranih vzorcev, kar se ujema s serološkimi analizami, saj IL-6 spodbuja zorenje in diferenciacijo limfocitov B v plazmatke, IFN $\alpha$  pa spodbuja izdelovanje protiteles, ki so jih dokazali tako v sinovialni tekočini kot v serumu. Pri več vzorcih smo zaznali tudi IL-1 beta, ki ima glavno vlogo aktivacije imunskega sistema pri akutnem vnetju. Aktivira lahko makrofage in limfocite T, kar vodi do produkcije drugih citokinov in kemokinov (Dinarello, 1998).

Pri detekciji IL-2, IFN $\gamma$  in IL-12 smo dobili dvojno linijo citokinov z različno molekulsko maso. Razlog za takšne rezultate je lahko v strukturi citokinov, saj je večina citokinov

sintetiziranih v neaktivni obliki, ki ima drugačno molekulsko maso kot njihova aktivna oblika. Za pretvorbo iz neaktivnih v aktivne citokine sta pogosto potrebni proteolitična cepitev (tako se zmanjša njihova molekulska masa) ali glikozilacija (molekulska masa se poveča). V vzorcih sinovialne tekočine, ki smo jih testirali, sta se lahko pojavili obe obliki IL-2, IL-12 in IFN $\alpha$ , ki sta ohranili vezavna mesta (epitope), na katera so se lahko vezala primarna protitelesa. Druga možnost pa je, da so primarna protitelesa navzkrižno reagirala s proteinimi v sinovialni tekočini, ki so imela podobna vezavna mesta kot tarčni citokini.

Glede na vse dobljene rezultate lahko sklepamo, da bakterija *Mycoplasma synoviae* sproža nastanek vnetja v sklepih kokoši, saj smo v testiranih vzorcih sinovialnih tekočin dokazali prisotnost različnih citokinov, ki so ključni povzročitelji vnetja. Pri kokoših, ki niso bile okužene z bakterijo *Mycoplasma synoviae*, je vsebnost vnetnih citokinov zanemarljiva oziroma ti niso prisotni.

Tako kot pri kronični avtoimunski bolezni revmatoidnem artritisu ljudi je tudi pri kužnem sinovitisu kokoši povišana vsebnost nekaterih vnetnih citokinov v sinovialni tekočini, medtem ko vsebnosti protivnetnih citokinov nismo testirali, saj nismo imeli primernih protiteles za detekcijo.

Vloga citokinov pri sesalcih je dobro definirana, kar potrjuje tudi mnogo publikacij, ki opisujejo tako strukturo citokinov kot njihov pomen pri zdravju organizma. V nasprotju so bili ptičji citokini do nedavnega le slabo definirani tako v strukturi kot v funkciji. V zadnjih letih sta ptičja imunologija in genetika močno napredovali. Prišlo je do odkritij velikega spektra citokinov, predvsem pri kokoših in puranih. Prav tako se je razširil spekter njihove uporabe. Citokini imajo velik potencial pri kontroli infekcijskih bolezni pri perutnini. Raziskuje se predvsem njihova uporaba kot terapevtsko sredstvo za zdravljenje in preprečevanje bolezni. Citokini imajo velik potencial tudi kot dodatek cepivom, ki bi lahko specifično aktivirala imunski sistem, kar bi zagotovilo učinkovito zaščito (Wigley in Kaiser, 2003).

## 5.2 SKLEPI

- V testiranih vzorcih sinovialnih tekočin smo dokazali prisotnost različnih citokinov.
- Za vsak posamezni citokin smo ugotovili, da je njegova vsebnost različna pri različnih vzorcih sinovialnih tekočin.
- Najvišjo koncentracijo citokinov smo dokazali pri vzorcih št. 1, 3, 8 in 10. Pri teh vzorcih so bili prisotni vsi citokini razen IL-18.
- Najnižjo koncentracijo citokinov smo dokazali pri vzorcih, označenih s številkami od 13 do 18.
- Posredni imunoencimski test (DIBA) je nezanesljiv, saj so bili vzorci, ki smo jih uporabili, neredčeni in posledično se rezultati tega testa niso ujemali z rezultati

detekcije s specifičnimi protitelesi, ki smo jih dobili po končani elektroforezi in prenosu proteinov iz gela na membrano.

- *Mycoplasma synoviae* sproža nastanek vnetja v sklepih kokoši.

## 6 POVZETEK

Tako pri pticah kot pri sesalcih se imunski sistem na prisotno bakterijsko okužbo najprej odzove s prirojeno imunostjo, ki ni specifična, vendar onemogoča hitro širjenje patogena. Imunski odgovor se prične s povečanim dotokom krvi na okuženo mesto zaradi prisotnosti določenih kemičnih stimulantov (najpogosteje produktov patogenega organizma) ter s sintezo različnih molekul, kot so eikozanoidi in citokini. Ti s svojim delovanjem aktivirajo in spodbujajo imunski sistem organizma, ki pospešeno omejuje in odstranjuje prisotno okužbo (Razin in Tully, 1995; Nascimento, 2005; Razin in sod., 1998).

*Mycoplasma synoviae* je bakterija, ki okužuje dihalni trakt ptic. Zanjo je značilno, da raste izjemno počasi, da se pritrja na tarčne gostiteljeve celice in da se uspešno iznika imunskemu odgovoru gostitelja. Hkrati imajo vse mikoplazme lastnost, da stimulirajo makrofage, monocite, celice T in celice NK, kar privede do produkcije različnih molekul, kot so dejavniki tumorske nekroze (TNF alfa), interlevkini (IL-1, 2, 6) in interferoni (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  in IFN $\gamma$ ). Ker je *Mycoplasma synoviae* izjemno persistentna, se tudi po stimulaciji teh vnetnih celic ne odstrani popolnoma. Vnetne celice so tako konstantno stimulirane in to lahko privede do imunske tolerance, avtoimunske bolezni in masivne infiltracije limfnih celic v respiratorni trakt ter sklepe okuženih kokoši (Lockaby in sod., 1998, 1999; Kleven, 2003).

*Mycoplasma synoviae* lahko pri pticah povzroči tudi bolezen, ki se imenuje kužni sinovitis. To je akutna ali kronična bolezen, ki napade predvsem sinovialne membrane sklepov in povzroči vnetje ovojnici (sinovitis). Klinični znaki se kažejo v zmanjšani rasti, bledem grebenu, nasršenem perju in oteklih sklepih. Okužba se lahko hitro prenaša tako na potomce (bakterija prehaja v jajca kokoši nesnic) kot tudi z aerosoli na druge kokoši (Kleven, 2003).

Pri bakterijski okužbi pogosto prihaja do vnetnega odziva, pri čemer se močno povečajo koncentracije vnetnih celic kot tudi citokinov, ki jih te celice proizvajajo. Različni citokini imajo v organizmu različne funkcije. Tako na primer IL-6 in IFN $\gamma$  spodbujata zorenje in diferenciacijo limfocitov B v plazmatke in posledično povečano produkcijo protiteles. IFN $\alpha$  spodbuja ali zavira izdelovanje protiteles. IL-1 $\beta$  aktivira makrofage in limfocite T, kar privede do produkcije drugih citokinov, hkrati pa povira telesno temperaturo organizma (McInnes in Schett, 2007; Goldsby in sod., 2000). V diplomski nalogi smo želeli dokazati prisotnost različnih citokinov v vzorcih sinovialnih tekočin okuženih kokoši z bakterijo *Mycoplasma synoviae* in ovrednotiti, kakšna je zastopanost posameznih citokinov v različnih vzorcih.

Za dokaz citokinov smo proteine v vzorcih sinovialne tekočine najprej ločili z SDS-PAGE elektroforezo. SDS-PAGE je gelska elektroforeza, ki omogoča ločevanje proteinov le glede na njihovo molekulsko maso, saj smo proteine predhodno denaturirali in jim dodali negativni naboj (z uporabo natrijevega dodecil sulfata), da so vsi proteini v vzorcu potovali po gelu proti pozitivno nabiti elektrodi (anodi). Tako ločene proteine smo nato prenesli iz poliakrilamidnega gela na nitrocelulozno membrano z uporabo metode »western blot«. Prenos je potekal 40 minut pri konstantni vrednosti električnega toka  $0,8 \text{ mA/cm}^2$ . V tem času so se uspešno prenesli proteini z molekulsko maso od 10 do 47 kDa, kar se je opazilo tudi z intenziteto barve dodanega markerja. Nato smo izrezali del membrane, ki je vseboval proteine z omenjeno molekulsko maso, jo posušili in izvedli detekcijo s pomočjo primarnih protiteles (preglednica 3) in s hrenovo peroksidazo konjugiranih sekundarnih protiteles. Ko smo detektirali vse iskane citokine, smo iz dobljenih nitroceluloznih membran sestavili profil citokinov, ki je prikazan na sliki 10. Dobljeni rezultati detekcije na sliki 10 so se razlikovali od rezultatov, ki smo jih dobili s posrednim encimskoimunskim testom (DIBA) (slika 8). Dokazali smo, da so bili citokini IL-1 $\beta$ , IL-6 in IFN $\alpha$  prisotni pri vseh vzorcih sinovialne tekočine, razen pri vzorcih, označenih s številkami od 13 do 18, ter da so bile vsebnosti zaznanih citokinov precej različne v posameznih vzorcih sinovialnih tekočin.

## 7 VIRI

- Abbas A. K., Lichtman A. H. 2006. Basic immunology: Functions and disorders of the immune system. Philadelphia, PA, Saunders Elsevier: 301 str.
- ABCAM®. 2011. Cytokine and growth factors. Massachusetts, Abcam: 28 str.  
<http://docs.abcam.com/pdf/general/Cytokines-and-Growth-Factors.pdf> (23. mar. 2011).
- Avrămescu C., Vere C. C., Mărgăritescu C., Turculeanu A., Bălăşoiu M., Rogoz S. 2005. Cytokinin panel in rheumatoid arthritis and correlation with histological patterns of synovitis -- active type of disease. Romanian Journal of Morphology and Embryology, 46, 2: 87–92.
- Avian Blood Cells. 1996. New York. Cornell University, College of Veterinary Medicine: 1str.  
<http://ahdc.vet.cornell.edu/sects/clinpath/modules/heme1/avian.htm> (23. mar. 2011).
- Balu S., Kaiser P. 2003. Avian interleukin-12beta (p40): cloning and characterization of the cDNA and gene. Journal of Interferon & Cytokine Research, 23, 12: 699–707.
- Balu S., Rothwell L., Kaiser P. 2011. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-12. Veterinary Immunology and Immunopathology, 140, 1–2: 140–146.
- Beck G., Habicht G. S. 1994. Invertebrate cytokines. Annals of the New York Academy of Sciences, 712: 206-212
- Benčina D., Dovč P., Mueller-Premru, Avšič M., Županc A., Sočan T., Beovič M., Arne B., Narat M. 2000. Intrathecal synthesis of specific antibodies in patients with invasion of the central nervous system by *Mycoplasma pneumoniae*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 19: 524–530.
- Davidson College. 2001. SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). North Carolina, Department of Biology, Davidson College: 1 str.  
<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/SDSPAGE/SDSPAGE.html#SDS> (2001).
- Dinarello C. A. 1998. Interleukin-1. V: The cytokine handbook. 3<sup>rd</sup> ed. Thompson A. W. (ed.). San Diego, Academic Press: 35–71.

- Gaffen S. L., Goldsmith M. A., Greene W.C. 1988. Interleukin-2 and the Interleukin-2 receptor. V: The cytokine handbook. 3<sup>rd</sup> ed. Thompson A. W. (ed.). San Diego, Academic Press: 73–131.
- Gobel T. W. F., Chen H. C., Shrimpf J., Carlo E. Grossin C. E., Bernot A., Bucy R. P., Auffray C., Cooper M. D. 1994. Characterization of avian natural killer cells and their intracellular CD3 protein complex. European Journal of Immunology, 24: 1685-1601
- Goldsby R. A., Kindt T. J., Osborne B. A. 2000. Immunology. 4<sup>th</sup> ed. New York, W. H. Freeman and Company: 642 str.
- Hirano T. 1998. Interleukin 6. V: The cytokine handbook. 3<sup>rd</sup> ed. Thompson A. W. (ed.). San Diego, Academic Press: 197–227.
- Janeway C. A., Walport J. M., Travers P. 2001. Immunobiology: the immune system in health and disease. New York, Garland Pub: 600 str.
- Kaiser P., Wain H. M., Rothwell L. 1998. Structure of the chicken interferon- $\gamma$  gene, and comparison to mammalian homologues. Gene, 207: 25–32.
- Kaiser P., Bumstead N., Goodchild M., Atkinson D., Rothwell L. 2001. Characterising chicken cytokine genes – IL-1b, IL-6, IL-15 and IL-18. V: Current progress on avian immunology research: Proceedings of the 7<sup>th</sup> avian immunology research group. Ithaca, New York. Schat K. A. (ed.). Pennsylvania, American Association of Avian Pathologists, Inc.: 27–32.
- Kawai T., Akira S. 2006. Innate immune recognition of viral infection. Nature Immunology, 7, 2: 131–137.
- Kleven S. H. 2003. *Mycoplasma synoviae* infection. V: Diseases of poultry. 11<sup>th</sup> ed. Saif Y. M., Barnes H. J., Glisson R. J., Fadly A. M., McDougald L. R., Swayne D. E. (eds.). Ames, Iowa State University Press: 756–766.
- Komabiotech. 2008. Western Blotting. Gayang Technotown, Komabiotech: 1 str.  
<http://www.komabiotech.co.kr/www/techniques/immunodetection/wbProtocol.html> (23. mar. 2011).
- Koren S., Avšič Županc T., Drinovec B., Marin J., Poljak M. 2007. Splošna medicinska virologija. Ljubljana, Medicinski razgledi: 180 str.

- Le Y., Zhou Y., Iribarren P., Wang J. 2004. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cellular & Molecular Immunology*, 1, 2: 95–104.
- 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.
- Lockaby S. B., Hoerr F. J., Lauerman L. H., Smith B. F., Samoylov A. M., Toivio-Kinnucan M. A., Kleven S. H. 1999. Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 43: 251–261.
- Maniloff J. 1992. Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis. Washington, D. C., American Society for Microbiology: 580 str.
- Marois C., Picault J. P., Kobisch M., Kempf I. 2005. Experimental evidence of indirect transmission of *Mycoplasma Synoviae*. *Veterinary Research*, 36, 5–6: 759–69.
- Martin P., Leibovich S. J. 2005. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*, 15, 11: 599–607.
- McInnes I. B., Schett G. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology*, 7: 429–442.
- Monari C., Bevilacqua S., Piccioni M., Pericolini E., Perito S., Calvitti M., Bistoni F., Kozel T. R., Vecchiarelli A. 2009. A microbial polysaccharide reduces the severity of rheumatoid arthritis by influencing Th17 differentiation and proinflammatory cytokines production. *Journal of Immunology*, 183: 191–200.
- Nascimento E. R., Pereira V. L. A., Nascimento M. G. F., Barreto M. L. 2005. Avian mycoplasmosis update. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 7, 1: 1–9.
- Ogawa Y., Calhoun W. J. 2006. The role of leukotrienes in airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118, 4: 789–798.
- Okamura H., Tsutsui H., Komatsu T., Yutsudo M., Hakura A., Tanimoto T., Torigoe K., Okura T., Nukada Y., Hattori K., Akita K., Namba M., Tanabe F., Konishi K., Fukada S., Kurimoto M. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*, 378: 88–91.
- Razin S., Yogev D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 1094–1156.

- Razin S., Tully J. G. 1995. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology: Vol. 1, Molecular characterization. San Diego (CA), Academic Press: 483 str.
- Roitt I., Brostoff J., David K. M. 2001. Immunology. 6<sup>th</sup> ed. London, Elsevier Science: 440 str.
- Rothwell L., Hamblin A., Kaiser P. 2001. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-2. Veterinary Immunology and Immunopathology, 83, 3–4: 149–160.
- Schägger H., Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry, 166, 2: 368–379.
- Schneider K., Puehler F., Baeuerle D., Elvers S., Staeheli P., Kaspers B., Kirsten C. Weining K. C. 2000. cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18. Journal of Interferon & Cytokine Research, 20, 10: 879–883.
- SDS-PAGE Acrylamide gel. 2009. San Francisco, Wikimedia foundation: 1 str.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:SDS-PAGE\\_Acrylamide\\_gel.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:SDS-PAGE_Acrylamide_gel.png) (23. mar. 2011).
- SDS-PAGE Electrophoresis. 2009. San Francisco, Wikimedia foundation: 1 str.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:SDS-PAGE\\_Electrophoresis.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:SDS-PAGE_Electrophoresis.png) (23. mar. 2011).
- Sekellick M. J., Ferrandino A. F., Hopkins D. A., Marcus P. I. 1994. Chicken interferon gene: Cloning, expression, and analysis. Journal of Interferon Cytokine Research, 14: 71–79.
- Stepaniak J. A., Shuster J. E., Hu W., Sundick R. S. 1999. Production and *in vitro* characterization of recombinant chicken interleukin-2. Journal of Interferon Cytokine Research, 19: 515–526.
- Sumi S., Mathai A., Radhakrishnan V. V. 2009. Protein blotting and detection: Methods and protocol. Methods in Molecular Biology, 536: 89–93.
- Sundick R.S., Gill-Dixon C. 1997. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. Journal of Immunology, 159: 720-725.
- Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of Innate resistance and adaptive immunity. Nature Reviews, 3: 133–143.

Vasconcelos A. T. R., Ferreira H. B., Bizarro C. V., Bonatto S. L., Carvalho M. O., Pinto P. M., Almeida D. F., Almeida L. G. P., Almeida R., Alves-Filho L., Assunção E. N., Azevedo V. A. C., Bogo M. R., Brígido M. M., Brocchi M., Burity H. A., Camargo A. A., Camargo S. S., Carepo M. S., Carraro D. M., de Mattos Cascardo J. C., Castro L. A., Cavalcanti G., Chemale G., Collevatti R. G., Cunha C. W., Dallagiovanna B., Dambrós B. P., Dellagostin O. A., Falcão C., Fantinatti-Garbogini F., Felipe M. S. S., Fiorentin L., Franco G. R., Freitas N. S. A., Frías D., Grangeiro T. B., Grisard E. C., Guimarães C. T., Hungria M., Jardim S. N., Krieger M. A., Laurino J. P., Lima L. F. A., Lopes M. I., Loreto É. L. S., Madeira H. M. F., Manfio G. P., Maranhão A. Q., Martinkovics C. T., Medeiros S. R. B., Moreira M. A. M., Neiva M., Ramalho-Neto C. E., Nicolás M. F., Oliveira S. C., Paixão R. F. C., Pedrosa F. O., Pena S. D. J., Pereira M., Pereira-Ferrari L., Piffer I., Pinto L. S., Potrich D. P., Salim A. C. M., Santos F. R., Schmitt R., Schneider M. P. C., Schrank A., Schrank I. S., Schuck A. F., Seuanez H. N., Silva D. W., Silva R., Silva S. C., Soares C. M. A., Souza K. R. L., Souza R. C., Staats C. C., Steffens M. B. R., Teixeira S. M. R., Urményi T. P., Vainstein M. H., Zuccherato L. W., Simpson A. J. G., Zaha A. 2005. Swine and poultry pathogens: The complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. Journal of Bacteriology, 187, 16: 5568–5577.

Western blot transfer. 2009. San Francisco. Wikimedia foundation: 1 str.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Western\\_blot\\_transfer.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Western_blot_transfer.png) (23. mar. 2011).

Wigley P., Kaiser P. 2003. Avian cytokines in health and disease. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 5, 1: 1–14.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mojci Narat in mladi raziskovalki Daliborki Dušanić za vodenje, strokovno pomoč in nasvete pri izvedbi diplomske naloge.

Prav tako se zahvaljujem vsem na oddelku za zootehniko, ki so mi pri praktičnem delu v laboratoriju priskočili na pomoč.

Nenazadnje bi se zahvalil še staršem in punci Anji za spodbudo in zaupanje.