

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ



Маријана В. Ковачић

СТРУКТУРНЕ И ФУНКЦИОНАЛНЕ ОСОБИНЕ
ИМУНОКОМПЛЕКСА КОД ТЕЛАДИ ОБОЛЕЛЕ ОД
БРОНХОПНЕУМОНИЈЕ

Докторска дисертација

Београд, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Marijana V. Kovačić

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF
IMMUNE COMPLEXES IN CALVES WITH
BRONCHOPNEUMONIA

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018

Ментори:

проф. др Зоран Вујчић, редовни професор
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

др Весна Илић, научни саветник
Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

Чланови комисије:

проф. др Зоран Вујчић, редовни професор
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

др Весна Илић, научни саветник
Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

проф. др Марија Гавровић Јанкуловић, редовни професор
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

Датум одбране:

Ова докторска дисертација урађена је у сарадњи Хемијског факултета, Универзитета у Београду, Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду и Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, у оквиру истраживања које финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Експериментални део ове дисертације је највећим делом урађен у Институту за медицинска истраживања. Електрофореза протеина у гелу агарозе је урађена у Институту за трансфузију крви Србије. Фотон корелациона спектроскопија је урађена у Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду. Проточна цитометрија највећим делом урађена је у Универзитетској дечјој клиници, у Београду.

У експерименталном делу рада учествовали су:

Маријана Ковачић, др Весна Илић, др Ивана Дрвеница, др Славко Мојсиловић, др Александра Арсић, др Јелица Грујић Милановић и др Милан Иванов, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду;

др Наталија Фратрић, др Душан Мишић, др Сунчица Борозан и др Зорана Милановић, Факултет ветеринарске медицине, Универзитета у Београду;

др Дејан Вуковић, Пољопривредни комбинат „Београд“;

др Оливера Савић и др Ивана Јагличић, Институт за трансфузију крви Србије, Београд;

др Срђа Јанковић, Универзитетска дечја клиника, Београд.

Захвалница

Драгој менторки др Весни Илић, научном саветнику Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду, дугујем неизмерну захвалност на помоћи приликом израде ове докторске дисертације. Хвала Вам на подршци, стрпљењу, разумевању и знању којем сте ме учили, а које ми је омогућило да са лакоћом превазилазим све препреке у изради ове докторске дисертације.

др Зорану Вујчићу, професору Хемијског факултета, Универзитета у Београду захваљујем се на сугестијама, великој мотивацији и несебичној помоћи у изради ове докторске дисертације.

Захваљујем се др Марији Гавровић-Јанкуловић, професору Хемијског факултета, Универзитета у Београду на великој помоћи и усмерењу током писања ове дисертације.

др Наталији Фратрић, професору Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду захваљујем се на свим саветима и помоћи при изради ове дисертације.

др Владану Чокићу, научном саветнику Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду, хвала на великој помоћи и подршци да свој рад наставим у лабораторијама Института.

Посебно се захваљујем мојим драгим колегиницама др Драгани Марковић, др Ирени Масловарић, др Ивани Дрвеници и Ани Станчић, из Групе за имунологију Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду, на лепом дружењу, саветима и помоћи у изради ове дисертације.

Захвалност дугујем мојим родитељима, сестри, брату и баки што су великим стрпљењем, љубављу и разумевањем утицали и били подршка свих година учења и усавршавања.

Мом Јовану, захваљујем што је био мој ветар у леђа и што је увек веровао у мене.

Аутор

СТРУКТУРНЕ И ФУНКЦИОНАЛНЕ ОСОБИНЕ ИМУНОКОМПЛЕКСА КОД ТЕЛАДИ ОБОЛЕЛЕ ОД БРОНХОПНЕУМОНИЈЕ

ИЗВОД

Бронхопнеумонија је најчешће обољење телад у свету али до данас није разјашњено зашто имунски систем телад не одговара ефикасно на узрочнике бронхопнеумоније. Вируси и бактерије узрочници бронхопнеумоније су коменсали и изазивају болест само када је имунолошка одбрана слаба, која код телад настаје због незрелости имунског система и изложености стресу узрокованом неповољним временским приликама и смештајем у слабо вентилиране, пренасељене и влажне објекте. Како је ово обољење узрок великих економских губитака на говедарским фармама постоји велика потреба да се проблем овог обољења реши.

Имајући у виду да је имунитет телета на неке од узрочника бронхопнеумоније посредован IgG антителима и да би имунокомплекси које ова антитела формирају могли да учествују у патогенези бронхопнеумоније, ова докторска дисертација је за циљ имала испитивање протеинских и липидних компоненти циркулишућих имунокомплекса (CIC) телад старих три месеца, оболелих од бронхопнеумоније изазване бактеријом *Pasteurella multocida*, најчешћим узрочником болести на фармама у околини Београда, и испитивање улоге CIC као модулятора функција ћелија имунског одговора.

У овој докторској дисертацији CIC су изоловани преципитацијом протеина крвног серума полиетилен гликолом. Ниво CIC телад са бронхопнеумонијом је у односу на здраву телад био повећан. CIC телад са бронхопнеумонијом су били већи. У CIC обе групе телад на основу хидродинамичког радијуса издваја се пет група честица; у CIC болесне телад најзаступљеније су биле честице од 1426 ± 291 nm; а у CIC здраве телад честице хидродинамичког радијуса од 225 ± 33 nm и 734 ± 174 nm. Зета потенцијал CIC телад са бронхопнеумонијом је био незнатно већи од зета потенцијала CIC здраве телад.

У серумима телад са бронхопнеумонијом детектован је повишен ниво укупних протеина. Концентрација γ и α глобулина била је повећана и у серумима

и СИС болесне телади. Концентрација IgG и трансферина је била повишена у серумима али не и у СИС болесне телади. Како је имунски одговор у пастерелозама говеда посредован антителима IgG класе, даља пажња је била усмерена на анализу IgG у саставу СИС и крвним серумима телади. Говеђи IgG су изузетно хетерогени, и да би се добиле детаљније информације о утицају болести на експресију појединих форми овог молекула, анализирани су укупни IgG у серумима и серумским фракцијама обogaћеним у садржају IgG. Резултати су показали да су IgG СИС, укупни IgG серума и IgG у фракцији риванол-преципитабилних протеина серума и протеина серума изолованих анјонском хроматографијом, били електрофоретски хетерогени и састојали су се од три или четири субфракције различитих молекулских маса. Само у фракцијама IgG молекула који су изоловани анјонском хроматографијом детектована је промена код болесне телади. Код ових IgG садржај фракције највеће молекулске масе је био повишен. Афинитетном хроматографијом на протеин G и протеин A сефарози, из СИС, серума и серумских фракција, и здраве и болесне телади изоловани су IgG са којима су копреципитирале и друге протеинске фракције. Искључиво са IgG из СИС су копреципитирале фракције од 80, 78 и 73 kDa. И код здраве телади и код телади са бронхопнеумонијом удео IgG2 у IgG СИС је био нижи од удела IgG2 у укупним IgG серума и IgG серумских фракција. Разлика у гликозилацији IgG из СИС серума и риванол-преципитабилних протеина серума здраве и болесне телади није нађена. Повишена гликозилација је детектована само у фракцији серумских IgG изолованих анјонском хроматографијом.

Како су липиди (ендогеног и егзогеног порекла) и липопротеини имунорегулаторни молекули и улазе у састав СИС, анализарана је њихова концентрација и састав у серумима и СИС телади. У серумима здраве и телади са бронхопнеумонијом детектовани су α (HDL)- и β (LDL) липопротеини и хиломикрони. У СИС здраве и болесне телади детектована је само једна фракција липопротеина широке електрофоретске покретљивости у пре- β , β и пост- β зони. У серумима телади са бронхопнеумонијом концентрација триглицерида и холестерола у саставу HDL је била повишена, а концентрација LDL-холестерола смањена. Концентрација ових липида у СИС је била испод нивоа детекције. У серумима и здраве телади и телади са бронхопнеумонијом доминирали су неутрални липиди који су чинили више од 80% укупних липида, док су у СИС

доминирали фосфолипиди са уделом од 80%. Како су фосфолипиди најзаступљенија фракција липида СИС у њима је анализиран садржај масних киселина. У највећем проценту у фосфолипидима СИС је била присутна олеинска киселина. У СИС телади са бронхопнеумонијом садржај олеинске и вакценске киселине је био благо повишен, садржај миристинске, палимитинске, стеаринске, линолне и арахидонске снижен, а садржај палмитолеинске и дихомо-гама линолеинске киселине непромењен. Ниво пероксидације липида серума и СИС здраве и телади са бронхопнеумонијом се није разликовао.

СИС су имуномодулатори, зависно од своје величине и молекулског састава конституената, и локалног ћелијског и цитокинског миљеа, могу да покрену про- или анти- инфламаторне реакције. Имуномодулаторна улога СИС телади са бронхопнеумонијом али и СИС здраве телади није позната и у овом раду испитиван је утицај СИС на функцију гранулоцита и мононуклеарних ћелија периферне крви. СИС и здраве телади и телади са бронхопнеумонијом су модулисали адхезију, синтезу реактивних кисеоничних једињења, вијабилност, апоптозу, ћелијски циклус и пролиферацију мирујућих леукоцита периферне крви здраве телади. Ефекат је био или стимулаторан или инхибиторан, што је зависило од структуре СИС условљене здрављем телади, и од функционалног стања и степена активације респондерских ћелија.

Резултати ове докторске дисертације показују да се СИС тромесечне телади оболеле од бронхопнеумоније изазване бактеријом *P. multocida* разликују од СИС здраве телади по величини и саставу протеинских и липидних конституената и по капацитету да модулишу неке од функција леукоцита. Резултати ове докторске дисертације доприносе објашњењу механизма настанка и развоја бронхопнеумоније код телади и могли би да буду значајни у развоју нових имунолошких поступака за превенцију болести.

Кључне речи: Бронхопнеумонија телади; Циркулишући имунокомплекси; IgG; Липиди; Липопротеини.

Научна област: Биохемија

Ужа научна област: Имунохемија

УДК број: 577.37(043.3)

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF IMMUNE COMPLEXES IN CALVES WITH BRONCHOPNEUMONIA

ABSTRACT

Bronchopneumonia is the most frequent cause of calves' ailments around the world. The absence of adequate immune response to causative agents of bronchopneumonia in calves remained unclear to date. The infectious agents of virus and/or bacterium origin associated with bronchopneumonia are omnipresent harmless commensals in the cattle population that induce illness when the host defense is depressed by environmental stress factors and inability of calves to fully respond to an antigenic stimulus due to the fragile nature of the immune system. The disease is a leading cause of economic loss in the livestock industry worldwide which points to the necessity of attending to this problem with great attention.

Having in mind that immune response to certain pathogens responsible for bronchopneumonia in calves is IgG antibody-dependent, the presence of immune complexes containing these antibodies could have an important role in the pathogenesis of bronchopneumonia. The goal of this doctoral dissertation was to investigate the protein and lipid components of circulating immune complexes (CIC) of calves three months old, diagnosed with bronchopneumonia caused by *Pasteurella multocida* bacterium, and their role as modulators of immune response.

CIC were isolated by polyethylene glycol precipitation. The level of polyethylene glycol precipitating CIC in calves with bronchopneumonia compared to healthy calves was higher. In calves with bronchopneumonia CIC were larger in size. CIC were composed of five groups of corpuscles; In healthy calves the most abundant corpuscles in CIC were of 1426 ± 291 nm in diameter; In healthy calves corpuscles with hydrodynamic radius of 225 ± 33 nm and 734 ± 174 nm were mostly present in CIC. In calves with bronchopneumonia zeta potential of CIC was slightly higher than zeta potential of CIC in healthy calves.

In calves with bronchopneumonia increased level of serum total proteins was detected. The concentration of γ and α globulins in the serum and in CIC of diseased calves was higher. The concentration of IgG and transferrin in the sera was higher, but remained unchanged in CIC of diseased calves. As the immune response in bovine

pasteurellosis was mediated by IgG antibodies, further attention was focused on analyzing the blood serum IgG and IgG of CIC. Bovine IgG are extremely heterogeneous group of molecules. To obtain detailed information on the effect of the disease on the expression of particular forms of IgG, IgG from unfractionated serum and IgG enriched serum fractions were analyzed. The results showed that IgG from CIC, total serum IgG, IgG from the rivanol-precipitable serum protein fraction and IgG from serum protein isolated by anion chromatography were electrophoretic heterogeneous, consisting of three or four subfractions of different molecular weight. The influence of disease on IgG molecules isolated by ion-chromatography was observed and the content of IgG fraction of highest molecular weight was elevated in diseased calves. Further on, IgG from CIC, serum and serum fractions were isolated by affinity precipitation on Protein G and Protein A. Several other proteins of different molecular mass were coprecipitated with IgG. Proteins of 80, 78 and 73 kDa were solely coprecipitated with IgG from CIC. In healthy calves and in calves with bronchopneumonia, the IgG2 fraction in IgG from CIC was lower than IgG2 fraction in total serum IgG and IgG from serum fractions. The difference in glycosylation of IgG from CIC, serum and rivanol-precipitable serum of healthy and diseased calves was not found. Elevated glycosylation was detected only in IgG isolated by anion exchange chromatography.

Lipids (endogenous and exogenous origin) and lipoproteins are the components of CIC. They are known for their immune regulatory function, which is why we have analyzed the level of concentration and composition of lipids present in the sera and in CIC of healthy and diseased calves. In sera of both healthy controls and calves with bronchopneumonia α (HDL)- и β (LDL) lipoproteins and chylomicrons were detected. In healthy and diseased calves one fraction of lipoproteins with electrophoretic mobility registered in pre- β , β and post- β zone was detected in CIC. In sera of calves with bronchopneumonia the concentration of HDL-containing triglycerides and cholesterol was increased; the concentration of LDL-cholesterol was lowered. Concentration of these lipids in CIC was lower than the limit of detection. In sera of calves with bronchopneumonia neutral lipids represented more than 80% of total lipids. Conversely, in CIC phospholipids were predominant (80%) lipids. Phospholipids are most abundant fraction of lipids in CIC which is why the content of fatty acids was analyzed. Oleic acid was most abundant in phospholipids of CIC. In calves with bronchopneumonia the

content of oleic and vaccenic acids was slightly increased in CIC, the content of myristic, palmitic, stearic, linoleic and arachidonic acids was lowered and the content of palmitoleic и dihomo-gamma-linolenic acid remained unchanged. The lipid peroxidation level and the level of CIC in the serum of both healthy and diseased calves showed no difference.

CIC act as immune modulators and can direct immune response to a pro- or anti-inflammatory direction, which depends on the size and molecular composition of CIC, and cell and cytokine milieu in affected tissue. The immunomodulatory role of CIC in calves with bronchopneumonia and in CIC of healthy calves is not known, and in this study the influence of CIC on the function of peripheral blood granulocytes and mononuclear cells was examined. CIC of healthy controls and calves diagnosed with bronchopneumonia showed the capacity to modulate the adhesiveness, synthesis of reactive oxygen species, viability, apoptosis, cell cycle and proliferation of peripheral blood leukocytes of healthy calves. The effect was either stimulatory or inhibitory, depending on CIC origin (healthy vs bronchopneumonic calves), and the functional state and degree of activation of responder cells.

The results of this doctoral dissertation indicate the difference in the level of CIC, their size, protein and lipid constituents, and ability to modulate the function of CIC leukocytes in three months old healthy controls and in calves with bronchopneumonia. The contribution and importance of these results, due to lack of well established pathophysiology, is thorough analyses of the pathogenetic mechanisms underlying the calf bronchopneumonia caused by *P. multocida*, and to define new immunological procedures for the prevention of the disease.

Key words: Calf bronchopneumonia; Circulating immune complexes; IgG; Lipids; Lipoproteins.

Scientific field: Biochemistry

Scientific discipline: Immunochemistry

UDC number: 577.37(043.3)

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА КОРИШЋЕНИХ У ТЕКСТУ

AA	раствор мономера акриламида
ABTS	2,2'-азино-бис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)
AOPP	производи оксидације протеина
APS	амонијум персулфат
BCA	бицинхолинска киселина
BSA	говеђи серум албумин
CBB	енгл. coomassie brilliant blue
CIC	циркулишући имунокомплекси
DLS	динамичко расипање светлости
DMSO	диметил сулфоксид
DTT	дитиотреитол
FBS	фетални телећи серум
FRAP	укупан антиоксидативни капацитет плазме
FSC	предње расипање светлости
GLC	гасно-течна хроматографија
HDL	липопротеини велике густине
HMW	протеини велике молекулске масе
IEX	јоноизмењивачка хроматографија
IgA	имуноглобулин А
IgG	имуноглобулин G
IgM	имуноглобулин M
IL- 1	интерлеукин 1
IL- 12	интерлеукин 12
IL- 6	интерлеукин 6
INF γ	интерферон γ
LDL	липопротеини мале густине
LPS	липополисахарид
MDA	малонил диалдехид
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид
MNC	мононуклеарне ћелије
NBT	нитро плаво тетразолојум хлорид

PAGE	полиакриламид гел електрофореза
PBS	пуферисани физиолошки раствор
PCS	фотон корелациона спектроскопија
PEG	полиетилен гликол
PHA	фитохемаглутинин
PI	пропидијум јодид
PMA	форбол миристат ацетат
ROS	реактивне кисеоничне врсте
SDS	натријум додецил сулфат
SDS-PAGE	натријум додецилсулфат полиакриламид гел електрофореза
SSC	бочно расипање светлости
TBARS	супстанце реактивне са тиобарбитурном киселином
TLC	танкослојна хроматографија
TLR	Toll- like рецептор
TMED	N,N,N',N'-тетраметилетилендиамин
TNF α	туморски некротички фактор α
TPTZ	2,4,6-три[2-пиридил]-s-триазин
TRIS	трис(хидроксиметил) аминометан
UV	ултраљубичасти спектар

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ОПШТИ ДЕО	3
2.1 Респираторне болести телади	3
2.2 Микробиолошки узрочници бронхопнеумоније телади	4
2.2.1 <i>Pasteurella multocida</i> као узрочник бронхопнеумоније телади.....	6
2.3 Имуноглобулини у респираторним болестима телади.....	10
2.3.1 Имуноглобулини говеда.....	10
2.3.1.1 IgG говеда	16
2.3.1.2 Имуноглобулини говеда у патогенези брохопнеумоније.....	19
2.4 Имунокомплекси у патогенези бронхопнеумоније код телади	20
2.4.1 Липиди као конституенти СИС.....	24
3. НАШИ РАДОВИ.....	29
3.1 Физичко-хемијске особине PEG преципитабилних СИС телади са бронхопнеумонијом.....	30
3.1.1 Ниво СИС	30
3.1.2 Величина СИС и величина конституената СИС	31
3.1.3 Зета потенцијал СИС.....	32
3.1.4 Протеини крвног серума и СИС.....	35
3.1.4.1 Анализа протеина крвног серума и СИС електрофорезом у гелу агарозе .	35
3.1.4.2 Анализа протеина серума и СИС PAGE.....	41
3.1.4.3 Анализа IgG из крвног серума и СИС телади.....	47
3.1.4.3.1 IgG крвног серума телади изоловани јоноизмењивачком хроматографијом.....	48
3.1.4.3.2 IgG крвног серума телади изоловани риванолском преципитацијом	51
3.1.4.3.3 IgG крвног серума и СИС здраве телади и телади са бронхопнеумонијом изоловани афинитетном хроматографијом	57
3.1.4.3.4 Гликани IgG серума и СИС	69
3.1.5 Липопротеини и липиди серума и СИС телади са бронхопнеумонијом.....	72
3.1.5.1 Липопротени крвног серума и СИС телади са бронхопнеумонијом	72
3.1.5.2 Концентрације неутралних липида крвног серума и СИС	76
3.1.5.3 Анализа састава липида крвног серума и СИС хроматографијом на танком слоју силика гела.....	78

3.1.5.4 Маснокиселински профил фосфолипида серума и СИС	81
3.1.6 Степен оксидативних оштећења липида и протеина крвног серума и СИС и антиоксидативни статус крвног серума	89
3.2 In vitro испитивање утицаја СИС здраве теледи и теледи са бронхопнеумонијом на функцију гранулоцита и периферне крви здраве теледи	90
3.2.1 Испитивање ефекта СИС на адхезију MNC и гранулоцита.....	91
3.2.2 Испитивање модулаторне улоге СИС на синтезу ROS у MNC и гранулоцитима	92
3.2.3 Испитивање ефекта СИС на вијабилност MNC и гранулоцита	94
3.2.4. Испитивање ефекта СИС на апоптозу MNC и гранулоцита у 24h и 48h културама	95
3.2.5 Испитивање ефекта СИС на ћелијски циклус MNC.....	101
3.2.6 Испитивање ефекта СИС на пролиферацију MNC.....	103
3.2.7 Коментар резултата in vitro испитивања ефекта СИС теледи са бронхопнеумонијом и здраве теледи на функционалне одлике леукоцита периферне крви здраве теледи	105
3.3 ЗАКЉУЧЦИ	108
4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	110
4.1 Материјал.....	110
4.2 Списак главне коришћене опреме	112
4.3 Методе.....	113
4.3.1 Изоловање крвног серума	113
4.3.2 Изоловање СИС преципитацијом полиетилен-гликолом (PEG).....	113
4.3.3 Одређивање величине конституената и зета потенцијала СИС.....	114
4.3.4 Изоловање IgG из крвног серума и СИС телета	116
4.3.4.1 Изоловање серумских IgG јоноизмењивачком хроматографијом.....	116
4.3.4.2 Изоловање IgG из крвног серума риванолском преципитацијом.....	118
4.3.4.3 Афинитетно изоловање IgG из серума, серумских фракција и СИС.....	119
4.3.5 Одређивање концентрације протеина у серумима, серумским фракцијама и СИС.....	120
4.3.6 Електрофоретске технике за анализу протеина крвног серума, серумских фракција и СИС	122
4.3.6.1 Електрофореза протеина у гелу агарозе	122

4.3.6.2 Електрофореза протеина у полиакриламидном гелу са додатком натријум додецил сулфата (енгл. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)	123
4.3.6.2.1 Електрофоретско раздвајање	123
4.3.6.2.2 Визуелизација протеинских фракција	126
4.3.6.2.3 Анализа обојених гелова	130
4.3.7 Електрофоретске технике за анализу липопротеина крвног серума и СИС ...	130
4.3.7.1 Анализа липопротеина електрофорезом у гелу агарозе	130
4.3.7.2 Анализа липопротеина у нативном полиакриламидном гелу	130
4.3.8 Методе за анализу липида крвног серума и СИС	132
4.3.8.1 Одређивање концентрације неутралних липида крвног серума	132
4.3.8.2 Раздвајање и идентификовање липида крвног серума хроматографијом на танком слоју силика гела	132
4.3.8.2.1 Екстракција укупних липида	132
4.3.8.2.2 Раздвајање класа неутралних липида	133
4.3.8.2.3 Раздвајање класа фосфолипида	133
4.3.8.3 Анализа маснокиселинског профила фосфолипида серума и СИС гасно-течном хроматографијом	134
4.3.8.3.1 Екстракција укупних липида и раздвајање класа неутралних липида	134
4.3.8.3.2 Метилација масних киселина	134
4.3.8.3.3 Анализа масних киселина гасно-течном хроматографијом	134
4.3.9 Одређивање укупног антиоксидативног статуса крвног серума	135
4.3.9.1 FRAP тест	135
4.3.9.2 АВТС тест	137
4.3.10 Одређивање степена оксидативних оштећења липида и протеина крвног серума и СИС	138
4.3.10.1 Одређивање нивоа пероксидације липида серума и СИС	138
4.3.10.2 Одређивање нивоа продукта узнапредовале оксидације протеина серума и СИС	138
4.3.11 Тестови за испитивање функционалних карактеристика леукоцита периферне крви	139
4.3.11.1 Реагенси за ћелијске културе и тестове	139
4.3.11.2 Припрема медијума, пуфера и раствора за ћелијске културе	140
4.3.11.3 Изоловање МНС и гранулоцита периферне крви телади	141
4.3.11.4 Тест адхезије МНС и гранулоцита периферне крви	142
4.3.11.5 Тест редукције NBT-а	142
4.3.11.6 МТТ тест	143

4.3.11.7 Методе проточне цитофлуориметрије	144
4.3.11.7.1 Анализа апоптозе бојењем ћелија Anexin V-FITC-ом и пропидијум јодидом	144
4.3.11.7.2 Анализа ћелијског циклуса MNC бојењем пропидијум јодидом	145
4.3.11.7.3 CFSE тест	146
4.3.12 Статистичка анализа	148
5. ЛИТЕРАТУРА.....	149

1. УВОД

Говеда су један од главних извора млечне и месне хране људи и њихова добробит је од суштинске важност за здравље људи. Бронхопнеумонија је најчешћи узрок разбољевања и смртности говеда у свету. У плућима оболеле животиње се јавља снажна запаљенска реакција чија је последица фиброза и губитак функционалног капацитета плућа. Болест има негативан утицај на прираст, а код животиња које се користе за обнову стада продужава се време првог телјења. Бронхопнеумонија узрокује велике економске губитке на говедарским фармама јер смртност може да буде и до 25% што са ценом третмана оболелих животиња повећава трошкове производње. Ефикасна вакцина за превенцију ове болести не постоји. Није разјашњено зашто имунски систем телади не одговара ефикасно на узрочнике бронхопнеумоније и зашто се након вакцинације не ствара протективни имунски одговор. Бактеријски узрочници бронхопнеумоније (*Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni*...) су коменсали и могу да изазову болест само када је имунолошка одбрана слаба (код телета је то повезано са укупном незрелошћу, преобладавањем Th2 имунским одговором и ниским садржајем имуноглобулина у серуму) и када су животиње изложене стресу (неповољне временске прилике, смештај у слабо вентилиране, пренасељене и влажне просторе). Имуни одговор на неке од бактеријских узрочника бронхопнеумоније телади је зависан од специфичних IgG антитела, при чему су од највећег протективног значаја антитела IgG2 подкласе, чија је синтеза део Th1 имунског одговора. У складу са протективном улогом имуноглобулина су и подаци да се серумом телета које је прележало бронхопнеумонију могу пасивно имунизовати друга телада, и да је инциденца бронхопнеумоније максимална код телади старих два до четири месеца. У том узрасту концентрација укупних серумских имуноглобулина и имуноглобулина специфичних за микробиолошке узрочнике бронхопнеумоније је на свом најнижем нивоу због скоро потпуног катаболизма колоидних IgG и непотпуне синтезе сопствених имуноглобулина. Додатну тежину у изучавању IgG посредованих болести говеда чини енормна антигенска и биохемијска хетерогеност говеђих IgG, која им даје статус инфракласе имуноглобулина.

Повишен ниво имунокомплекса који садрже IgG антитела је детектован у циркулацији, а депозити имунокомплекса заједно са хистолошким знацима инфламације су откривени у ткиву плућа оболелих животиња што указује да имунокомплекси имају улогу у настанку и развоју бронхопнеумоније код телади. Опште је познато да имунокомплекси делују као имуномодулатори који могу да покрену проинфламаторне или антиинфламаторне реакције зависно од своје величине, састава и структурних карактеристика њихових молекулских конституената (протеина, липида, нуклеинских киселина, полисахарида) и ћелијског и цитокинског састава на месту инфламације. Међутим, тачна улога имунокомплекса у патогенези бронхопнеумоније телади није разјашњена. Проблем у изучавању имунокомплекса у овој болести представља и њихова анатомска локација. У састав имунокомплекса у циркулацији (енгл. *circulating immune complexes*, CIC) улазе и имунокомплекси који „цуре“ из плућног ткива и због тога CIC представљају добар модел за изучавање имунокомплекса које није могуће изоловати директно са места инфламације.

Са циљем ближег дефинисања улоге CIC и његових конституената у патогенези бронхопнеумоније телади, у овој докторској дисертације је испитиван протеински и липидни састав CIC телади старих три месеца, оболелих од бронхопнеумоније изазване бактеријом *Pasteurella multocida*, и испитивана улога CIC као модулятора функција ћелија имунског одговора. Непосредни циљеви ове докторске дисертације били су:

1. Изоловати CIC здраве телади и телади са бронхопнеумонијом;
2. Одредити ниво, величину и зета потенцијал CIC;
3. Анализирати укупне протеине CIC и крвних серума;
4. Анализирати IgG из CIC и упоредити њихове особине са IgG крвних серума и протеинских фракција крвних серума који су обогаћени у садржају IgG;
5. Анализирати липопротеине и липиде CIC и крвног серума и анализирати масне киселине у саставу фосфолипида CIC и крвног серума;
6. Испитати утицај CIC на функционалне карактеристике леукоцита периферне крви телади: адхезивност, синтезу реактивних кисеоничних једињења (енгл. *reactive oxygen species*, ROS), вијабилност, апоптозу, ћелијски циклус и пролиферацију.

2. ОПШТИ ДЕО

2.1 Респираторне болести телади

Респираторне болести су после дијареје други највећи узрок смртности телади у свету. У говедарству ове болести проузрукују озбиљне економске губитке због велике смртности животиња, трошкова лечења и смањеног прираста након оздрављења. Проблем у истраживањима и изналажењима адекватних лекова представља то што су респираторне болести говеда мултифакторијалне и код њих се више инфективних и неинфективних узрочника, удружују и утичу на развој болести, због чега се сматра да не постоје два идентична случаја настанка и развоја ових болести [1]. Најчешће форме респираторних болести говеда су ензоотска пнеумонија, транспортна грозница, бактеријске и вирусне пнеумоније и бронхопнеумоније.

Бронхопнеумонија се код телади најчешће јавља од првог до четвртог месеца живота. Ова болест може бити изазвана вирусима и/или бактеријама. Клинички знаци бронхопнеумоније нису јединствени и зависе од старости животиње, микробијалног агенса узрочника болести и фазе болести. Најважнији и најранији знак ове болести је повишена телесна температура, праћена брзим плитким дисањем и кашљом. Цурење воденог или гнојног секрета из носа и очију и појачана саливација су такође једни од клиничких знакова болести. Болесна телада су и малаксала, без апетита и безвољна [2].

Данас се дијагноза бронхопнеумоније скоро искључиво поставља на основу клиничке слике. Међутим, Tothova и сар. [3] указали су да дијагноза заснована само на клиничкој слици није у потпуности адекватна нарочито зато што телада са почетним благим клиничким симптомима, а која се могу развити у тешке форме болести, могу остати недијагностификована након клиничког прегледа. За постављање тачне дијагнозе и одговарајуће терапије, поред клиничког прегледа (и у пракси недоступног радиолошког прегледа), потребне су додатне микробиолошке, хематолошке и биохемијске анализе.

Дуго година се бронхоалвеоларна лаважа, доста компликована за извођење, сматрала ретким поузданим тестом за анализу микробиолошких узрочника бронхопнеумоније. DeRosa и сар. [4] показали су да бактерије

изолиране из носног бриса одговарају онима на месту упале у плућима, а Taylor и сар. [5] доказали су да микробиолошка анализа изолата из носног бриса удружена са клиничким прегледом може значајно допринети успостављању дијагнозе и бољем третману. Иако се по аналогји са пнеумонијама код људи, повећана концентрација леукоцита у периферној крви и промена у њиховом диференцијационом броју може сматрати једним од сигурних знакова бронхопнеумоније телади, још 1982. године Yates [6] је указао да у различитим случајевима бронхопнеумоније код телади број леукоцита варира од леукоцитозе до леукопеније. Ове варијације последица су: 1) мултифакторијалне етиологије болести, 2) потентног имуномодулаторног/имуносупресивног дејства микробиолошких узрочника [7] и 3) временски зависне флукуације броја леукоцита у периферној крви након индукције болести [8].

Додатне биохемијске анализе, које се иначе широко примењују у истраживањима патогенезе болести, врло ретко се користе у ветеринарској пракси [9, 10, 11], пре свега зато што биомаркери бронхопнеумоније телади још увек нису прецизно дефинисани.

Постојали су покушаји да се концентрација протеина акутне фазе (хаптоглобин, серумски амилоид А, α (1)- кисели гликопротеин, фибриноген), број леукоцита периферне крви, концентрација хемоглобина, CO_2 и O_2 у крви, ниво СИС, фракције серумских протеина, матриксне металопроотеазе, аланин аминотрансфераза, аспартат аминотрансфераза, алкална фосфатаза и холестерол у липопротеинима ниске густине (енгл. *high density lipoproteins*, LDL) уведу као поуздани маркери болести [6, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18], али резултати нису увек конзистентни. Ова неконзистентност је последица комплексне етиологије бронхопнеумоније код телади, која резултира широким спектром облика болести, али и чињенице да су студије углавном изведене на малом броју говеда, да микробиолошки узрочници нису увек били исти, да фактори средине нису били уједначени и да нису коришћене исте дијагностичке методе.

2.2 Микробиолошки узрочници бронхопнеумоније телади

Истовремено присуство микробијалних агенаса, стрес и ниска концентрација имуноглобулина смањују могућност ефикасног имунског

одговора телади на микробиолошке узрочнике бронхопнеумоније. Сматра се да у основи настанка бронхопнеумоније код телади, слично пнеумонији код људи, лежи вирусно-бактеријски синергизам [2]. Вирусни патогени укључени у развој бронхопнеумоније су говеђи херпес вирус тип 1, параинфлуенца-3-вирус, говеђи вирус дијареје и говеђи респираторни синцицијални вирус. Најчешћи бактеријски патогени узрочници бронхопнеумоније су: *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida*, и *Histophilus somni* [2, 19, 20]. Из ткива плућа оболеле телади изоловане су и *Arcanobacterium pyogenes*, друге врсте *Pasteurella*, *Mycoplasma*, Грам позитивне стафилококе и стрептококе и вишеструки ентерични микроорганизми. Ови патогени имају јединствене и заједничке факторе вируленце који у великој мери доводе до стварања плућних лезија. Иако је квалитет и број истраживања у овој области порастао, још увек терапија и вакцинације које се примењују нису довољно успешне [21, 22, 23]. Од свих наведених узрочника присуство бактерије *Pasteurella multocida* је у свим досадашњим студијама детектована у назалном брису оболелих животиња на фармама у околини Београда [13, 17, 18, 24].

Често је бронхопнеумонија код говеда повезана са истовременим инфекцијама више патогена. Вирусни и бактеријски узрочници ове болести заједно су се развијали са својим домаћинима током милиона година. Колико год су разноврсне и прилагођене компоненте имунског система говеда, патогени су такође еволуирали различитим и софистицираним стратегијама да избегну/супримирају и урођени и стечени имунски одговор домаћина. Стратегије које је развио један патоген не само да помажу том патогену, него и другим патогенима, што доводи до погоршања болести.

Прва линија одбране урођеног имунског система је респираторни епител који обезбеђује механичку, хемијску и микробиолошку баријеру за патогене узрочнике болести. Бактерије узрочници болести се инхалирају путем капљица у плућа где адхерирају и колонизују епител плућа. Овако заражени епител секретује мукус и спречава даљу колонизацију бактерија, а присутни сурфактантни протеини А и D у епителу плућа, као и пептид дефенсин који везују за своју површину патогене чине их подложнијим фагоцитози макрофага и неутрофила [23]. Инфекција говеђим херпес вирусом типа 1 узрокује оштећење респираторног епитела који оштећује механизам мукозне одбране при чему се

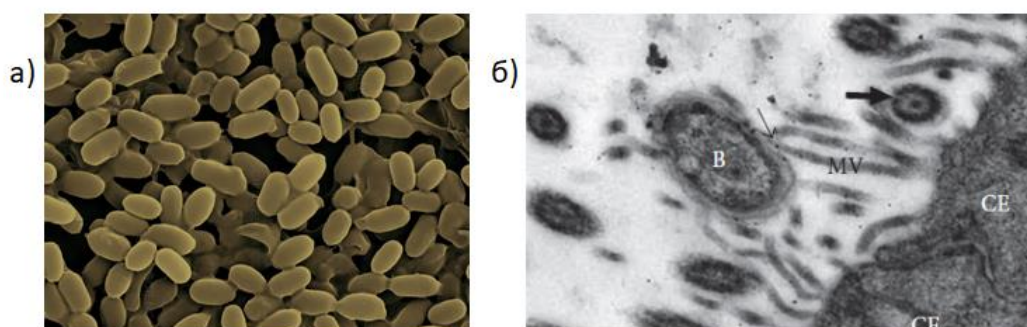
фаворизује миграција бактерија у плућа, и њихова пролиферација, што доводи до развоја болести. Директна инфекција ћелија имунског система вирусима узрочницима бронхопнеумоније је такође описана [19].

Бројни вирулентни фактори вирусних и бактеријских узрочника бронхопнеумоније спречавају улазак фагоцита и лимфоцита на место инфекције (нпр. блокирањем $\beta 2$ интегрина на њиховој површини), инхибирају фагоцитозу и унутраћелијско убијање фагоцитираних бактерија (спречавањем синтезе ROS), инхибирају синтезу интерферона и других солубилних медијатора, инхибирају пролиферацију и индукцију апоптозе и анергије Т и Б лимфоцита, директно инхибирају синтезу МНС молекула I и II класе чиме утичу на капацитет презентације антигена и способност елиминације антигена различитим ефекторним механизмима, луче екстраћелијске протеолитичке ензиме који деградују молекуле антитела [19]. Потребно је нагласити да и стресогени фактори спољашње средине (хладноћа, малнутриција/дефицит гвожђа, јода, витамина D) такође инхибирају многе функције имунског система путем измене морфологије епитела доњег респираторног тракта, смањењем експресије toll-like рецептора (TLR) на епителним ћелијама и леукоцитима, смањењем експресије адхезивних молекула на леукоцитима, смањењем синтезе антимикробних пептида и лактоферина, редукцијом фагоцитозе и оскидативног праска у неутрофилима, смањењем пулмоналног клиренса бактерија [25]. Комплексна етиологија и мноштво стратегија за смањење активације имунског система ових патогена у комбинацији са незрелим имунским одговором телета објашњава неуспех имунског одговора телета у борби са узрочницима бронхопнеумоније и неуспех у прављењу ефикасне вакцине за заштиту од ове комплексне болести.

2.2.1 *Pasteurella multocida* као узрочник бронхопнеумоније теледи

Род *Pasteurella* обухвата 11 врста од којих *P. multocida* има четири подврсте *multocida*, *gallicida*, *septic* и *tigris*. Морфолошки, *P. multocida* је инкапсулирани кокобацил величине 1-2x0,3-1 μm , није покретна и не формира споре (слика 2.1). Високо је превалентна у популацијама и дивљих и домаћих животиња у свету. Део је нормалног микробиома оралног, назофарингеалног и

респираторног тракта али је и опортунистички патоген и примарни или секундарни узрочник бројних акутних и хроничних инфективних болести (пастерелоза, пнеумонија, атопијски ринитис, дермонекроза, апсцеси, менингитис, хеморагична септикемија) које код животиња доводе до великог разбољевања и смртности. Зоонозска трансмисија на људе постоји и дешава се као последица угриза или контакта са носним секретом животиња [26, 27, 28].



Слика 2.1. *Pasteurella multocida*. а) сканирајућа електронска микроскопија [29]; б) *P. multocida* у контакту са респираторним епителом горњег дисајног пута; В: *P. multocida*; СЕ: епителне ћелије; MV: микровили; стрелица: контакт бактерије и микровила [30].

На основу антигене структуре капсуле *P. multocida* се класификује у пет серогрупа (А, В, D, Е и F) и на основу антигене структуре липополисахарида (енгл. *lipopolysaccharides*, LPS) на 16 серотипова. *P. multocida* А:3 је најчешћи серотип изолован из говеда са респираторним болестима [27].

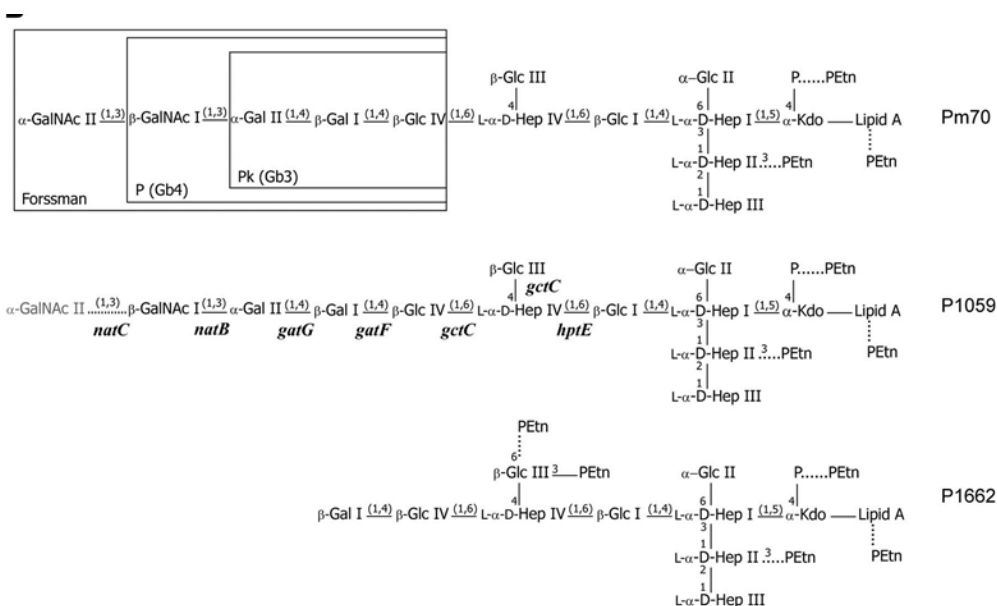
Као најзначајни фактори вируленције *P. multocida* описани су адхезини, полисахариди капсуле и липополисахариди, токсини и метаболички ензими. У адхезине, одговорне за адхеренцу бактерије за ћелије спадају фимбрије (тип IV), протеини спољашње мембране (OmpA), неураминидаза и филаментозни хемаглутинин. Осим OmpA и хем-везујући протеини (хемоглобин везујући протеин А и трансферин везујући протеин А) везујући се за фибронектин и друге протеине екстраћелијског матрикса помажу колонизацији бактерија [26, 27, 28, 31, 32].

Састав и структура капсуле *P. multocida* серотипа А је веома слична гликозаминогликанима и састоји се углавном од хијалурона, хепаросана и хондроитина. Капсула има значајну улогу у отпорности на фагоцитозу и лизу посредовану комплементом а неинкапсулирани мутанти су подложнији фагоцитози и много мање вирулентни [27, 31].

LPS *P. multocida* имају кључну улогу у патогенези болести, стимулишу хуморални имунитет и сматрају се као протективни антигени. Потпуно очувана структура LPS је неопходна за репликацију и патогени потенцијал *P. multocida*. LPS *P. multocida* се састоји од три региона (слика 2.2): 1) Липид А којим се LPS усидрује/укотвљује у спољашњу мембрану; 2) Унутрашње језгро које постоји у две гликоформе А и Б. Обе гликоформе имају три хептозе везане преко *Kdo* низа (енгл. *3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid*) за липид А, али гликоформа А има један *Kdo* низ (фофорилисан на позицији четири) а гликоформа Б има и други *Kdo* низ везан за четврту позицију првог *Kdo* низа; 3) Спољашње језгро које се састоји од хептозе, глукозе, галактозе, глукозамина и галактозамина. О антиген се не налази у саставу LPS *P. multocida*, па највећа структурна/антигенска разноврсност оваквог LPS потиче од шећера у његовом саставу и начина њиховог везивања. Постоје различите структуре спољашњег језгра који су одговорни за 15 од 16 серотипова *P. multocida*. Само серотипови 2 и 5 имају идентично спољашње језгро а разликују се по присуству или одсуству *Petn* (фосфатодил етанол амина) везаног за другу хептозу унутрашњег језгра [28].

LPS се сматра главним имуногеном *P. multocida* а имунолошки одговор на стимулацију је по правилу специфичан за сероваријанту. Поред улоге протективног антигена, LPS индукује снажну инфламаторну реакцију и сматра се да је одговоран за имунопатолошке феномене који доводе до акутне упале плућа и септикемије [26, 27, 28, 31]. На мишјем моделу је показано да пречишћени LPS *P. multocida* индукује синтезу проинфламаторних цитокина IL-1, IL-6, TNF- α , и имунорегулаторних IFN- γ и IL-12 [33]. LPS *P. multocida*, на дозно зависан начин стимулише адхезију говеђих неутрофила за ендотелне ћелије *in vitro* [34]. LPS *in vitro* на дозно и временски зависан начин стимулише пролиферацију/повећава вијабилност укупних моноклеарних ћелија периферне крви (енгл. *mononuclear cells*, MNC) одраслих говеда али и индукује апоптозу посредовану каспазама у

лимфоцитима, неутрофилима, моноцитима и диференцираним макрофагама из периферне крви [35].



Слика 2.2. Схематски приказ структуре *P. multocida* сероваријанти 3 и 4. Приказана је само гликоформа А унутрашњег језгра. Италиком словима испод хемијских веза су приказани гени за гликозилтрансферазе за које се претпоставља да учествују у синтези спољашњег језгра LPS. GalNAc (N-ацетил-галактозамин); Gal (галактоза); Glc (глукоза); Hep (хептоза); PEtn (фосфатидилетанол амин); Kdo (3-дезокси-D- манно-октулозонске киселине); P (фосфат) [36].

Ензими који имају битну улогу у вирулентности и патогенези *P. multocida* су сијалинидазе и хијалуронидазе. Сијалинидазе имају јачи ефекат, јер уклањањем сијалинске киселине са гликозилованих протеина и липида мембране ћелија домаћина, смањује имунолошку одбрану домаћина [31]. У *in vitro* експериментима протеазе које секретују изолати *P. multocida* хидролизују IgG здраве телади, али и протеине екстраћелијског матрикса, па стога протеазе играју важну улогу у колонизацији ткива [37, 38, 39].

И компоненте спољашње мембране (протеини и липопротеини) су битни имуногени, имају улогу и заштитних антигена али имају битног удела у патогенези бронхопнеумоније код телади. По својој функцији они су 1) структурни протеини: Smallb-barrel membrane anchors, OmpA и PmOmpA; 2) транспортни протеини: OmpF (неспецифични порин), TolC и AcrAB (2DRD) су

три компоненте ефлукс пумпе. Док су Trp32 (1XS5) и MetNI део метионин ABC транспортног система; 3) везујући протеини: FerA и HasR су представници TonB зависног система за преузимање гвожђа; 4) ензими везани за мембрану: фосфолипаза OMPA и две сијалинидазе NanH, NanB; 5) адhezини: OmpX, тип 4 пили, и филаментозни хемаглутинин протеин FhaB и FhaC [32].

Имунски одговор на *P. multocida* је посредован антителима. Новорођена телад након узимања колострума стичу пасивну имуност на *P. multocida* посредовану антителима из колострума. Ова антитела, углавном IgG1 изотипа, су краткоживећа и на најнижем нивоу код телади старих између 60 и 90 дана. Овај пад специфичних IgG1 антитела је праћен порастом синтезе сопствених IgM и IgG2 специфичних за *P. multocida* који свој максимум концентрације достижу између 150. и 180. дана живота [26, 40].

Антигени одговорни за настанак ефикасног *P. multocida* протективног имунског одговора нису још у потпуности дефинисани. LPS индукује одговор специфичан за сероваријанту, а на мишјем моделу је показано да имунизација са рекомбинантним OmpA индукује снажан, али непротективни Th2 одговор посредован IgG1 антителима [26]. За сада једино живе атенуиране вакцине могу да индукују протективни одговор против различитих сојева *P. multocida*. Овај одговор покрећу још недефинисани тзв. „не- LPS“ епитопи на површини бактерије. Иако експримирани на површини бактерије, антигени капсуле нису од значаја за развој протективног имунског одговора [28].

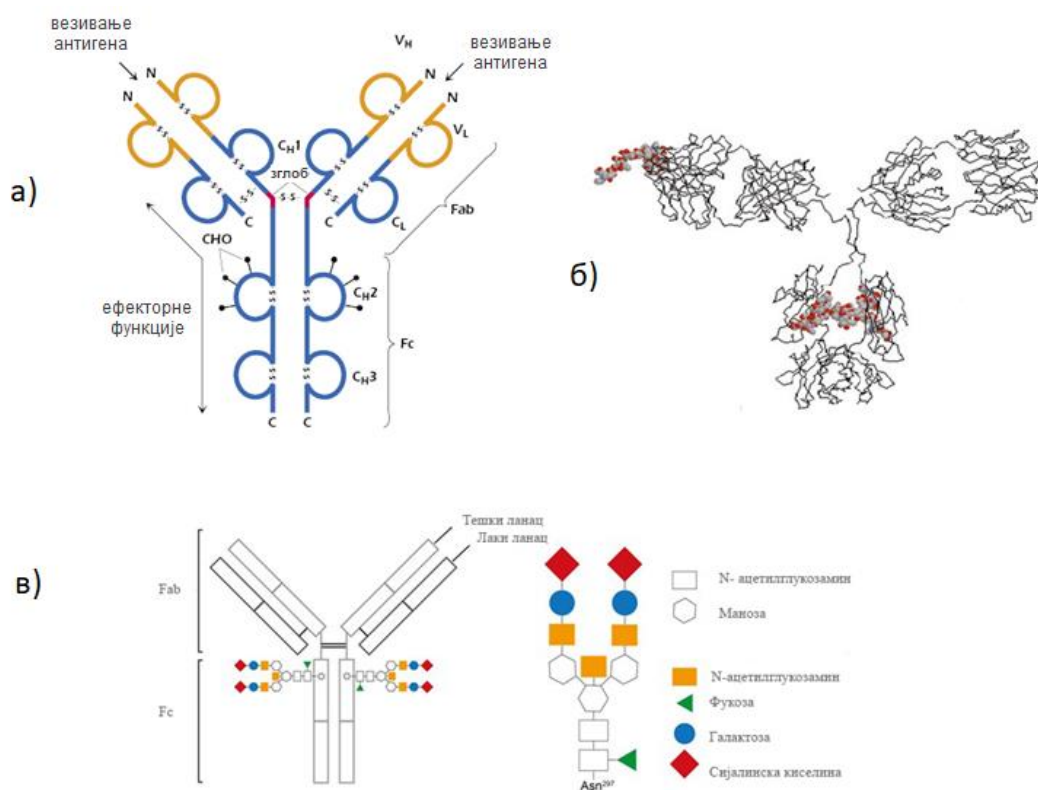
2.3 Имуноглобулини у респираторним болестима телади

2.3.1 Имуноглобулини говеда

Имуноглобулини су протеини са биолошком функцијом антитела. Они су главни ефекторни молекули хуморалне гране имунитета, реагују са антигенима/патогенима и посредују у њиховом уклањању из организма. Имуноглобулини имају две независне функције: функцију препознавања (везивања) антигена и ефекторну функцију (преципитација, аглутинација,

опсонизација, неутралисање антигена, активирање система комплемента, везивање за мембране ћелија које експримирају рецепторе за имуноглобулине, транспорт кроз мембрану, активација ћелија...) која омогућава ефикасно уклањање антигена из организма [41].

Основну структуру говеђег имуноглобулина, и имуноглобулина већине осталих врста сисара (са изузетком камила), чини четвороланчана функционална јединица састављена од два идентична краћа полипептидна ланца од 220 аминокиселина, који су означени као лаки (L) и два идентична дужа полипептидна ланца од 440 аминокиселина, који су означени као тешки (H) ланци (слика 2.3) [41, 42].



Слика 2.3. Имуноглобулини. а) структура основне функционалне јединице молекула имуноглобулина [43]; б) тродимензионална структура молекула IgG [44]; в) структура биантенарног олигосахаридног ланца у молекулу IgG [45].

Код говеда, као и код већине сисара, постоји пет изотипова тешких ланаца (μ , δ , γ , α и ϵ) и два типа лаких ланаца (κ и λ). Лаки и тешки ланци, као и тешки

ланци међусобно, повезани су ковалентним дисулфидним (S-S) везама и великим бројем нековалентних интеракција. Међусобним повезивањем тешки ланци формирају на средини молекула тзв. зглобни пептид који је битан за флексибилност молекула. Молекулска маса овакве макромолекулске јединице имуноглобулина износи 150 kDa. Та јединица се у неким имуноглобулинима понавља два или више пута стварајући полимерне форме имуноглобулина [42].

Говеда поседују пет класа имуноглобулина (IgG, IgM, IgA, IgE и IgD) дефинисаних на основу изотипа тешких ланаца. Лаки ланци већине говеђих имуноглобулина су λ типа, а само око 5% говеђих имуноглобулина има лаке ланце κ типа. IgG испољавају највећи молекулски полиморфизам. IgM и IgA су полимерне форме су грађене од пет (IgM) и две или три (IgA) основне структурне јединице [42, 46, 47]. Физичкохемијске особине изотипова имуноглобулина говеда приказани су у табели 2.1.

Табела 2.1. Физичкохемијске особине различитих изотипова имуноглобулина говеда [46, 47].

	IgM	IgG1	IgG2a	IgG3a	IgE	IgA
тешки ланци	μ	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	ϵ	α
лаки ланци [#]	λ	λ	λ	λ	λ	λ
молекулска маса тешких ланаца (kDa)	80	58	55	58	68	60
молекулска маса имуноглобулина (kDa)	1030	161-163	150-154			385-430
алотипови	IgM ^a IgM ^b IgM ^c	IgG1 ^a IgG1 ^b IgG1 ^c	IgG2 ^a IgG2 ^b	IgG3 ^a IgG3 ^b		
електрофоретска покретљивост	$\beta 2$	$\beta 2$	γ			$\beta 2$
S _{20,w}	19,2-19,7	6,5-7,2	6,5-7,2			10,8-11,0
угљени хидрати (%)	10-12	2,8-3,1	2,6-3,0			6-10
хексозе (%)	5,1-5,5	1,0-1,8	1,0-1,5			5,6
хексозоамини (%)	2,8-3,9	0,9-1,7	0,8-1,6			
сијалинска киселина (%)	1,4	0,3	0,2			
фукоза (%)	1,2	0,1-0,3	0,2-0,3			

[#] 95% имуноглобулина говеда има лаке ланце λ типа.

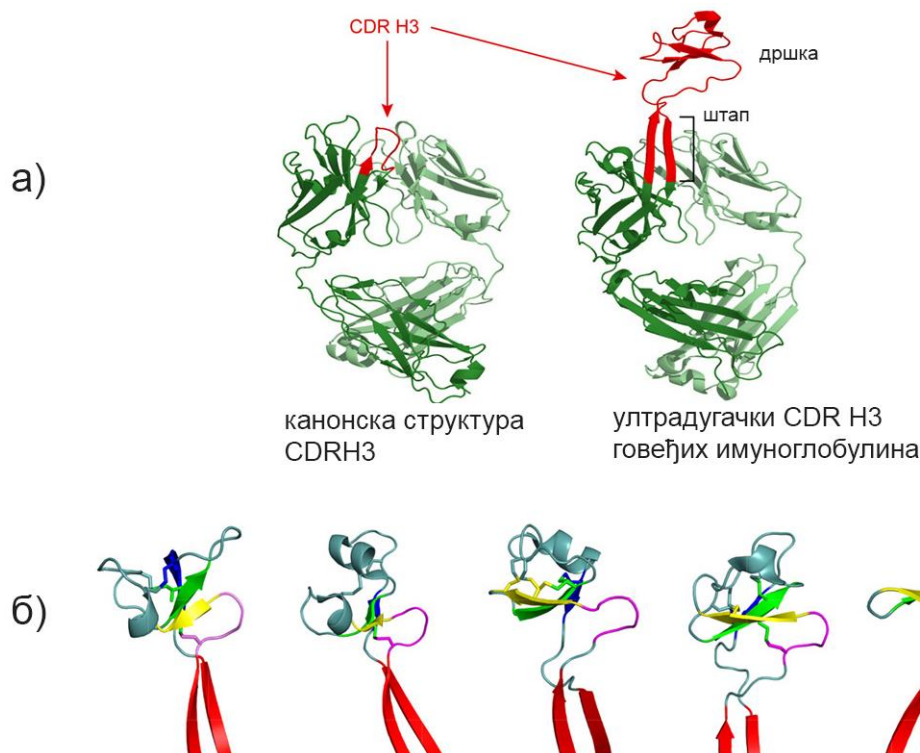
Тродимензионалну структуру молекула свих имуноглобулина карактерише постојање глобуларних јединица – домена којих у лаким ланцима има по два, а у тешким по четири или пет. Молекула у целини има 12 или 14 глобуларних домена. Сваки домен је одговоран за одређену биолошку активност имуноглобулина [41, 42].

С терминални домен лаког ланца (CL) и три С домена тешког ланца (CH1, CH2 и CH3) имају непроменљиве тј. константне низове аминокиселина, називају се константни домени. Специфичност говеђих IgG представља додатну интраланчану дисулфидну везу у CH1 домену [42]. Преко С домена тешких ланаца имуноглобулини остварују своје ефекторске функције [41, 42]. Константни делови тешких μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$ и $\gamma 2$ ланаца кодирани су са по једним геном који се налазе на 21. хромозому (21q23-24). Константни део λ лаких ланаца је кодиран са 4 гена (од којих су два псеудогени) који се налазе на 17. хромозому. Константни део κ лаких ланаца је кодиран са једним геном који се налази на 11. хромозому [47].

N-терминални домени тешких и лаких ланаца формирају два антиген-везућа места (активна места, паратопи) преко којих молекула интерагује са антигеном. Ови домени су означени као варијабилни (V) због променљивости у редоследу аминокиселина. Варијабилни домени лаких ланаца означени су симболом VL а варијабилни домени тешких ланаца означени су симболом VH. Нековалентним повезивањем домена у парове у имуноглобулинским молекулима се формирају три велике глобуларне субструктуре: два идентична, Fab региона (VH/VL, CH1/CL доменски парови) и један Fc регион (CH2/CH2, CH3/CH3, CH4/CH4 доменски парови) које спаја зглобни пептид. Зглобни пептид омогућава да се глобуларне субструктуре просторно оријентишу у зависности, или независно једне од других, што сваком молекулу даје могућност да различите интеракције оствари истовремено (слика 2.3) [41, 42].

Променљивост VL и VH домена је концентрисана у сегментима од по десетак аминокиселина, па су ти сегменти означени као хиперваријабилни (Hv) региони. Сваки лаки и тешки ланац има по три оваква региона који одређују конформацију, специфичност и афинитет антиген-везујућег места и омогућавају хемијску и геометријску комплементарност V домена структуре антигена, па се због тога називају регионима комплементарности – CDR (енгл. *complementary*

determining regions). Трећи CDR тешког ланца (CDRH3) има највећу променљивост и доприноси апсолутној специфичности антиген везујућег места према одређеној антигеној детерминанти (епитопу) антигена. H_v (CDR) региони су раздвојени мање променљивим сегментима од по 10 до 30 аминокиселина који се означавају као FR (енгл. framework regions) и сматра се да они имају улогу да у оквиру тродимензионалне структуре V домена омогуће такав положај H_v региона који ће обезбедити најбољи контакт ових региона са антигеном [41, 42]. Специфичност структуре говеђих имуноглобулина је и то што се поред каноничних CDRH3 дужине 5-10 аминокиселина на око 10% говеђих имуноглобулина свих изотипова налазе ултрадугачки CDRH3, дужине 48-80 аминокиселина (слика 2.4). Ови CDRH3 садрже вишеструке цистеине преко којих се формирају и до четири дисулфидне везе унутар CDR. Сматра се да у варијабилним регионима имуноглобулина који имају овако дугачке CDRH3, само CDRH3 везују антиген док остали CDR низови имају структурну улогу. Код говеда CDRH1 имају 8, а CDRH2 7 аминокиселина. На основу дужине аминокиселинског низа говеђи CDRH3 свих изотипова се деле на три групе: 1) кратки низови од 5 до 10 аминокиселина, које могу садржати и хидрофилне и хидрофобне аминокиселине, али никад не садрже цистеин; 2) CDRH3 средње дужине који имају низ од 12 до 31, предоминантно хидрофилних аминокиселина са једним до два цистеина и 3) ултрадугачки CDRH3 који имају низове више од 47 аминокиселина и који су богати глицином, тирозином и цистеином. Ови дугачки CDRH3 имају конзервисану тродимензионалну структуру коју формирају тзв. „штап“ са структуром β-трака и тзв. „дршка“ са конзервисаном структуром β плоче која служи као носач за два низа „петље“ и једном конзервисаном дисулфидном везом. Изузетно велики диверзитет ултрадугачког CDRH3 потиче од разлике у секвенцији аминокиселина, дужини аминокиселинског ланца и облику који одређују дисулфидне везе унутар CDRH3 региона [48, 49, 50, 51].



Слика 2.4. Структура ултрадугачког CDRH3 региона говеђих имуноглобулина. а) структура V региона хуманог антитела Yvo, са канонском структуром CDRH3, говеђег антитела B11, са ултрадугим CDRH3; црвено – CDRH3; тамно зелено - тешки ланци; светло зелено – лаки ланци. б) различите структуре „штапа“ и „дршке“ ултрадугачких CDRH3; црвено - β -трака „штапа“; магента β -завојница тип I, жуто, зелено и плаво – три антипаралелна β влакна, тамно плави клин – дисулфидне везе у „дршци“ [52].

Интересовање за имуноглобулине говеда је порасло последњих година када је откривено да се након имунизације крава HIV вирусом повећано синтетизују имуноглобулини са ултрадугачким CDRH3 који имају функцију високоафинитетних, широко неутралишућих, антитела која су у стању да неутралишу велики број сојева вируса. Овај резултат има огроман значај јер до ових експеримената са говедима, индукција синтезе широко неутралишућих анти HIV антитела код експерименталних животиња и код људи била је безуспешна, без обзира на коришћен имуноген [52]. Ова особина имуноглобулина са ултрадугачким CDRH3 отвара могућност њиховог коришћења у терапији патогена према којима до сада није постојао ефикасан имунски одговор.

2.3.1.1 IgG говеда

IgG говеда, као и IgG осталих сисара, у односу на остале класе имуноглобулина карактерише највећи молекулски полиморфизам, која им даје статус инфракласе имуноглобулина [46]. Полиморфизам говећих IgG се огледа у постојању три IgG подкласе (IgG1, IgG2 и IgG3) и већег броја алотипова (табела 2.1). Највећа разлика између подкласа IgG молекула огледа се у редоследу аминокиселина у региону зглоба, при чему IgG2 имају врло кратак зглобни пептид. Док IgG1 молекули имају три интраланчане дисулфидне везе, молекули осталих подкласа имају само једну. Алотипови IgG2 молекула се међусобно разликују по аминокиселинској секвенцији региона зглоба (хомологија је само 71%) [42, 46, 47]. Експресија ових алотипова је везана за узраст говеда, па се код ретких хетерозигота холштајн-фризијске расе IgG2a алотип јавља раније од IgG2b алотипа који се обично не детектује пре трећег или четвртог месеца старости [53].

IgG говечета су по основним физикохемијским параметрима слични IgG човека и других сисара (коэффициент седиментације 7S, проценат угљених хидрата 2-4% и др.) [46, 47]. За разлику од већине осталих сисара код којих се у колоструму накопљају IgA, код говеда IgG1 се накопља у колоструму. Код говеда нема трансплацентног преноса имуноглобулина па се младунчад рађају без имуноглобулина у крвном серуму. Пасивни имунитет младунчета остварује се преко колострума, који садржи имуноглобулине у високој концентрацији (40-200 mg/mL), при чему IgG1, који води порекло из крвног серума чине преко 75% свих имуноглобулина [54, 55]. Код говеда IgG1 су и главни имуноглобулини мукозних површина [56].

Полуживот IgG1 је два пута краћи ($9,6 \pm 1,2$ дана) од IgG2 ($17,8 \pm 0,8$ дана), а катаболизам IgG2 подкласе зависи од њене концентрације у циркулацији [57]. Молекули IgG1 подкласе активирају и хомологи и хетерологи комплемент, док IgG2 активирају само хомологи комплемент. IgG1 прелазе из крви у колострум што није случај са IgG2 подкласом. Подкласе IgG говечета показују разлике и у потенцијалу да индукују адхеренцију и фагоцитозу од стране неутрофила и моноцита. IgG2 аглутинирају партикуларне антигене док IgG1 не [46, 55, 58]. Већа хетерогеност IgG код говеда у односу на остале сисарске врсте огледа се у њиховој већој структурној разлици између подкласа IgG1 и IgG2. Једна од битних

разлика између ових подкласа огледа се у разлици електрофоретске покретљивости где су IgG2 означени као „спори“ ањонски, а IgG1 као „брзи“ катјонски имуноглобулини [59]. Такође имунохемијски се идентификује пет различитих форми говеђих IgG од који две припадају IgG1 а три IgG2 подкласи [60].

Иако се разликују по својим ефекторским функцијама методом „*pulsed neutron scattering*“ је показано да говеђи IgG1 и IgG2, без обзира на разлику у региону зглоба у воденим пуферима имају сличну тродимензионалну структуру. Дужи регион зглоба код IgG1 је заправо компактније структуре и код ова два изотипа не постоји разлика у растојању Fab и Fc региона [61]. Како је доступност Fc региона за интеракције са ћелијским Fc рецепторима и рецепторима за C1q компоненту комплемента врло слична код IgG1 и IgG2, ови аутори сматрају да је разлика у ефекторским функцијама ова два изотипа говеђих IgG највероватније последица делеције у региону зглоба. Због ове делеције IgG2, за разлику од IgG1, не може да оствари интеракције са рецепторима преко везног места које формирају аминокиселине региона зглоба и N-терминалног дела CH2 домена.

Угљени хидрати су интегрални део структуре свих молекулских варијанти IgG и чине 2-4% укупне масе сваког појединачног молекула (слика 2.3). Угљенохидратни садржај IgG чине олигосахаридне јединице (гликани) ковалентно везане за полипептидне ланце преко азота амидо групе аспарагина (тзв. N-везани гликани). Највећи део угљенохидратног садржаја IgG (2%) локализован је у Fc, а мањи (~0,8%) у Fab регионима. Гликани у имуноглобулинима одређују конформациону стабилност, електрични набој и растворљивост молекула, и могу утицати на афинитет везивања за антиген (гликани Fab региона), Fc γ рецепторе и C1q компоненту комплемента, на катаболизам, транспорт кроз мембране и секрецију молекула IgG (гликани Fc региона) [42,62, 63, 64, 65, 66].

У Fc региону гликани су везани N-везом за 297. аспарагин у трипептидној акцепторској секвенцији Asn-X-Ser-Thr у оба CH2 домена (X може бити било која аминокиселина осим пролина). Ова секвенција је у Fc региону еволутивно конзервирана, а гликани везани за њу су интегралне структурне компоненте CH2 домена IgG молекула. Олигосахаридни ланци у Fc региону IgG су највећим делом своје структуре смештени у унутрашњости домена за које су везани, а само су

делом истурени на њихову површину. Они „облажу” унутрашњу површину CH2 домена и остварују бројне интеракције са аминокиселинама у њима. Гликани Fab региона се могу јавити у варијабилном домену, тачније у хиперваријабилним регионима лаког и тешког ланца, ако се као резултат соматских мутација појави карактеристична секвенција Asn-X-Ser/Thr [42,62, 63, 64, 65, 66].

N-везани гликани у Fc региону IgG су сложеног биантенарног типа, а састављени су из конзервисаног пентасахаридног језгра са два N-ацетилглюкозамина (примарни и секундарни) и три манозе (GlcNac₂ Man₃), од кога се одвајају бочне гране хетерогеног састава: две, Man α 1-6 и Man α 1-3 (тзв. антене) са N-ацетилглюкозамином (GlcNac) на обе, са или без галактозе (Gal) на једној или обе и са или без сијалинске киселине (NeuAc) на једној или обе ове гране и, у неким молекулима, бочна грана са фукозом везаном за примарни додатни извор хетерогености представља присуство или одсуство фукозе и бисектног GlcNac (слика 2.3). За сваки тешки ланац IgG молекула могу се везати различито комбиновани олигосахаридни ланци (асиметрично гликозиловање) [42,62, 63, 64, 65, 66].

Студије у којима је анализирана гликозилација говеђих имуноглобулина су ретке. N-везани гликани у Fc регионима и говеђих IgG су по структури сложеног биантенарног типа, са фукозом, и различитим нивоом глукозе, док сијалинска киселина није присутна. Детектован је и низак садржај N-везаних гликана без фукозе, са бисектним GlcNac и сијалинском киселином на само једној грани [67]. Фујии и сар. [68] су показали да и говеђи и хумани IgG у свом саставу имају 9 варијанти биантенарних олигосахарида без бисектног GlcNac и 4 варијанте биантенарних олигосахарида са бисектним GlcNac. Код не-бисектних варијанти, галактозилација Man α 1-3 гране доминира у односу на Man α 1-6 грану, док код бисектних варијанти преобладава галактозилација Man α 1-6 гране. Иако су исти гликани нађени и на говеђим и на хуманим IgG, ниво ових гликана се разликује у ове две врсте. Најзаступљенији олигосахариди говеђих IgG су фукозиловани биантенарни олигосахариди, без бисектног GlcNac, који садрже галактозу на обе или само на Man α 1-3 грани. У односу на хумане IgG, ниво негалактозилованих IgG је низак и износи свега 15%.

2.3.1.2 Имуноглобулини говеда у патогенези бронхопнеумоније

Бронхопнеумоније код телаци се по правилу јављају од првог до петог месеца старости, када је концентрација серумских имуноглобулина (IgG1, IgG2 и IgA) најнижа [9]. О значају IgG, и то IgG2 подкласе, у бронхопнеумонијама говоре подаци да су IgG2 дефицијентна говеда и говеда са нижим титром IgG2 подложнија овој болести [58, 69]. У бронхопнеумонији која је експериментално индукована инфекцијом говеда бактеријом *Haemophilus somnus*, повећан титар IgG2 у бронхоалвеоларној течности корелира са нестанком бактерија из ње. Иако повећања титра IgG1 и IgA предходи повећању титра IgG2, уклањање бактерија се дешава тек када се концентрација IgG2 повећа [58, 70].

Серум телета које је прележало пнеумонију узроковану *H. somnus*, може се користити за пасивну имунизацију здраве телаци [53, 58, 71]. Имунодоминантни антигени *H. somnus* на које теле одговара производњом сопствених антитела су протеини спољашње мембране *H. somnus*, р78 и р40. Антитела на р78 су искључиво IgG1 изотипа, док су антитела на р40 и IgG1 и IgG2 изотипа. Само антитела на р40 су протективна, и то се десет пута већа заштита постиже IgG2 него IgG1 антителима. Антитела на р40 која припадају различитим подкласама се разликују по својој специфичности. Тако након делимичне протеолизе р40 антигена и раздвајања на SDS-PAGE, IgG2 антитела препознају пет протеолитичких фрагмената док IgG1 препознају само три [53, 58, 71].

Иако су антитела IgG2 подкласе означена као протективна, њихова ефикасност у заштити од *H. somnus* зависе од алотипа. Животиње које су хомозиготи за IgG2^a алотип (нпр. већина говеда холштајн фризијске расе), након вакцинације развијају највећи титар антитела на ову бактерију. Титар хомозигота за IgG2^b алотип је знатно нижи, док је код животиња хетерозигота за ова два алотипа вредност титар између ове две крајности. Известан број пиогених инфекција код говеда је узрокован бактеријама које у свом зиду имају протеине који се високим афинитетом везују за Fc регионе IgG, тзв IgBP (енгл. „Ig binding proteins“). IgBP су стафилококни протеин А, стрептококни протеин G, као и IgBP *H. somnus*. IgBP (пептиди високе молекулске масе) *H. somnus* везују само IgG2^b алотип. Везивање IgG2^b за на IgBP *H. somnus* повезана су са резистенцијом на лизу посредовану комплементом. У складу са тим, код IgG2^a хомозигота, код

којих нема IgG2^b молекула који би се везали за IgBP *H. somuns*, комплементом посредована лиза бактерије је могућа и због тога су IgG2^a хомозиготи отпорнији на инвазивне болести узроковане *H. somuns* [58].

2.4 Имунокомплекси у патогенези бронхопнеумоније код телади

Повишен ниво имунокомплекса који садрже IgG антитела је детектован у циркулацији [13], а депозити имунокомплекса заједно са хистолошким знацима инфламације су откривени у ткиву плућа оболелих животиња [72, 73], што указује да имунокомплекси имају улогу у настанку и развоју бронхопнеумоније код телади. Међутим, тачна улога имунокомплекса у патогенези бронхопнеумоније телади није разјашњена.

Формирање имунокомплекса између антигена и антитела специфичног за тај антиген је саставни део физиолошког хуморалног имунског одговора и предуслов за ефикасно уклањање антигена из организма [41]. Везивање имунокомплекса за компоненте система комплемента активира овај систем. Везивањем имунокомплекса за Fc рецепторе или рецепторе за компоненте комплемента поред ефекторне остварује се и њихова имунорегулаторна улога и повезује се урођени са адаптивним, и хуморални са целуларним имунским одговором [74, 75]. Имунокомплекси су важни елементи у успостављању имунолошких мрежа (идиотипских и изотипских) које представљају основ хомеостазе имунског одговора [76, 77].

Fratrić и сар. [78] су показали да се код здраве телади CIC у циркулацији могу детектовати већ шестог сата по рођењу. Значајно повећање нивоа CIC у циркулацији детектује се тридесетог дана по рођењу, након чега њихов ниво остаје непромењен све до краја предпреживарске фазе, до четвртог месеца живота. До првог месеца старости телади, с обзиром да су доминантни IgG серума IgG1 пореклом из колострума, само они и улазе у састав CIC. Телад стара месец дана у својим серумима имају све молекулске форме IgG које су присутне и у серумима одраслих животиња, али способност да формирају CIC имају само тзв. „брзи“, анјонски IgG, у којима предоминира IgG1. Код старије телади, и код

одраслих говеда све молекулске форме IgG које постоје у серуму имају капацитет формирања CIC.

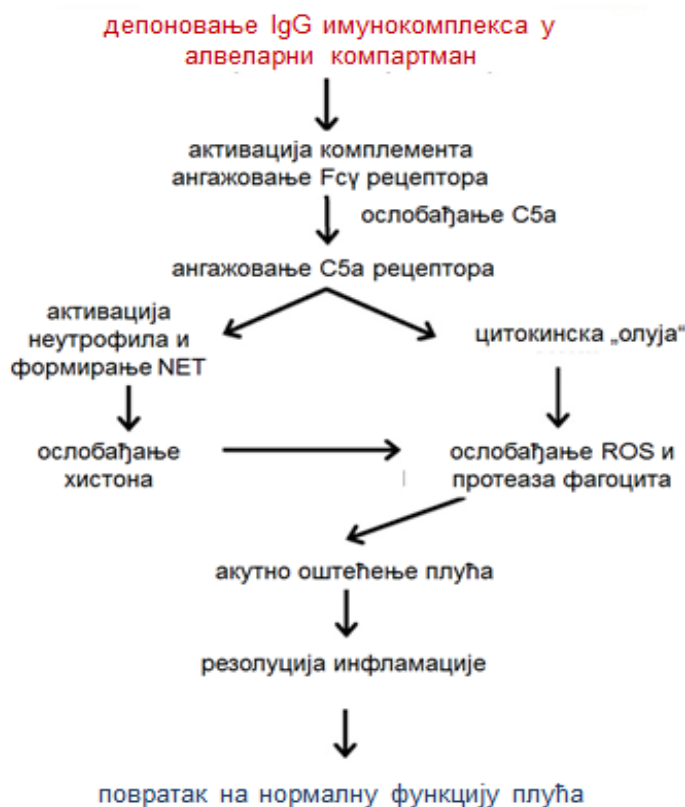
Имунски одговор у бронхопнеумонијама телади изазваним бактеријама је посредован антителима [26] и имунокомплексима које они формирају. Иако су депозити имунокомплекса заједно са хистолошким знацима инфламације откривени у ткиву плућа оболелих животиња [72, 73] подаци о структури и функцији имунокомплекса у овој болести скоро да не постоје. Група истраживача из Института за медицинска истраживања и Факултета ветринарске медицине Универзитета у Београду показала је, као и у пнеумонији код људи [79, 80], ниво PEG преципитабилних CIC (велике >19S и средње молекулске масе, 8-19S; [81]) повишен код телади са бронхопнеумонијом и да расте са напредовањем болести [13, 82]. Значај повећане концентрације PEG преципитабилних CIC у бронхопнеумонији код говеда није јасан. Код људи CIC велике молекулске масе (19S) су нађени у небактеријемичким пнеумококним пнеумонијама а CIC ниже молекулске масе (9S и 14S) су нађени у бактеријемичким пнеумококним пнеумонијама [83]. Слично овоме, код људи са пнеумонијама изазваним микоплазмама повећана концентрација мањих имунокомплекса који од имуноглобулинских изотипова садрже само IgG је повезана са егзацербацијом болести. Појава великих CIC које садрже и анти IgG антитела IgM изотипа (типа реуматоидног фактора) је повезана са смањењем плућне инфилтрације и уклањањем IgG-CIC интермедијерне величине и опоравком од болести [84, 85].

Наведена група истраживача из Универзитета у Београду је лектинским блотом анализирао место и ниво гликозиловања терминалних шећера N-ацетилглюкозамина, галактозе, сијалинске киселине, и фукозе на IgG у саставу PEG преципитабилних CIC здраве телади и телади са тешком клиничком формом бронхопнеумоније [13]. Код здраве телади на тешким ланцима су детектовани N-ацетилглюкозамин, галактоза, сијалинска киселина и фукоза, а на лаким ланцима N-ацетилглюкозамин, сијалинска киселина и фукоза, док галактоза није детектована. Само код болесних животиња на лаким ланцима је детектована галактоза. Код болесних животиња детектован је повећан садржај сијалинске киселине и на лаким и на тешким ланцима. Сијалинизовање IgG је повезано са смањењем про-инфламаторне улоге ових молекула. Adler и сар. [86] су показали смањено везивање асијалинизованих хуманих поликлонских IgG за FcγRIIIb на

гранулоцитима. Scallon и сар. [87] су показали да моноклонски IgG са сијалинизованим тешким ланцима имају нижу способност ћелијске цитотоксичности посредоване антителима, што је узроковано смањеним афинитетом везивања за FcγRIIIa на NK ћелијама. Kaneko и сар. [88] су показали да се ниво сијалинске киселине након стимулације партикуларним антигенима смањује, што је праћено променом активности од антиинфламаторне ка проинфламаторној. С обзиром на овакаву функцију сијалинизованих IgG и чињеницу да сијализовани гликопротеини имају заштитно дејство у акутним оштећењима плућа изазваним интраалвеоларним депоновањем имунокомплекса [89] ми смо претпоставили да повећана сијалинизација IgG у саставу CIC телади са бронхопнеумонијом можда представља један од механизма којим се имунски систем бори против неконтролисане активације ћелија и оштећања ткива плућа. У исто време, сматрамо да је повећана сијалинизација IgG и смањен афинитет везивања Fcγ рецептора барем делом одговорна за неефикасну елиминацију патогена.

Механизми којим имунокомплекси остварују своје дејство на ћелијске и молекулске компоненте имунског одговора у бронхопнеумонији телади нису познати. Податке о механизмима који имунокомплекси оштећују ткиво али и учествују у опоравку ткива плућа углавном су добијени у студија рађеним на експерименталним моделима глодара (слика 2.5). Резултати ових студија показали су да интраалвеоларне наслага имунокомплекса у чији састав улазе IgG (комплекси IgG и албумина формирани *in vitro*) активира систем комплемента и ткивне макрофаге на месту депоновања, активира епителне ћелије плућа, активира ендотел за којима следи привлачење неутрофила, моноцита и лимфоцита из циркулације и њихова активација у ткиву плућа. Активирани ћелије излучују проинфламаторне цитокине, ROS, липидне медијаторе, и бројне протеазе које изазивају акутну упалу плућа. У последњих десетак година објашњене су бројне функције ћелија (гранулоцита, макрофага, лимфоцита, ендотелних ћелија, епителних ћелија плућа), молекула и молекулских комплекса (комплемент, Fc рецептори, цитокини, липидни медијатори микроRNK, адхезивни молекули, матриксне металопротеазе, транскрипциони фактори, интрацелуларни сигнални молекули, мрежа екстрацелуларних замки неутрофила

и екстрацелуларни хистони) у оштећењима плућа посредованих имунокомплексима [91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101].



Слика 2.5. Механизам акутног оштећења плућа имунокомплексима који садрже IgG [90].

Инфламација ткива плућа изазвана депоновањем имунокомплекса завршава се ендогено, као резултат синтезе антиинфламаторних цитокина и инхибитора протеиназа леукоцита и матриксних металопротеаза који посредују поправку оштећеног ткива. Сматра се да је непрецизна регулација проинфламаторних и антиинфламаторних компоненти у повређеном плућном ткиву критична за патогенезу пнеумоније код људи и експерименталних животиња [102], али и код телади [7].

2.4.1 Липиди као конституенти СИС

Липиди и липопротеини су снажни имуномодулатори и природне инфекције или имунизације узрокују дислипидемије код људи, домаћих и експерименталних животиња [103, 104, 105, 106]. Такође познато је да хиполипидемије/ хипохолестеролемије које прате природне и експерименталне имунизације настају и као резултат формирања комплекса липида са имуноглобулинима [104]. У саставу имунокомплекса у неким болестима људи (артериосклероза, реуматоидни артритис...) детектоване су промене садржаја и структуре липида [103, 107] за које се претпоставља да су од значаја у патогенези ових болести.

Липиди су хетерогена група органских једињења, представљају изворе енергије, структурне и функционалне елементе ћелијске мембране, и имају бројне функције у регулацији хомеостазе. Према наелектрисању деле се на неутралне (триглицериди, холестерол и холестерил-естри) и поларне (фосфолипиди и гликолипиди) [108]. Липиди су нерастворни у води и у циркулацији се транспортују протеинима са којима формирају честице липопротеина (са естрима холестерола и триглицерида у језгру које окружују слободни холестерол), фосфолипиди и апопротеина. Липопротеини се према порасту густине и садржају апопротеина класификују као: хиломикрони, липопротеини са врло ниском густином (енгл. *very-low-density lipoproteins*, VLDL), липопротеини интермедијарне густине (енгл. *intermediate-density lipoproteins*, IDL), липопротеини ниске густине (енгл. *low-density lipoproteins*, LDL) и липопротеини високе густине (енгл. *high-density lipoproteins*, HDL) [109].

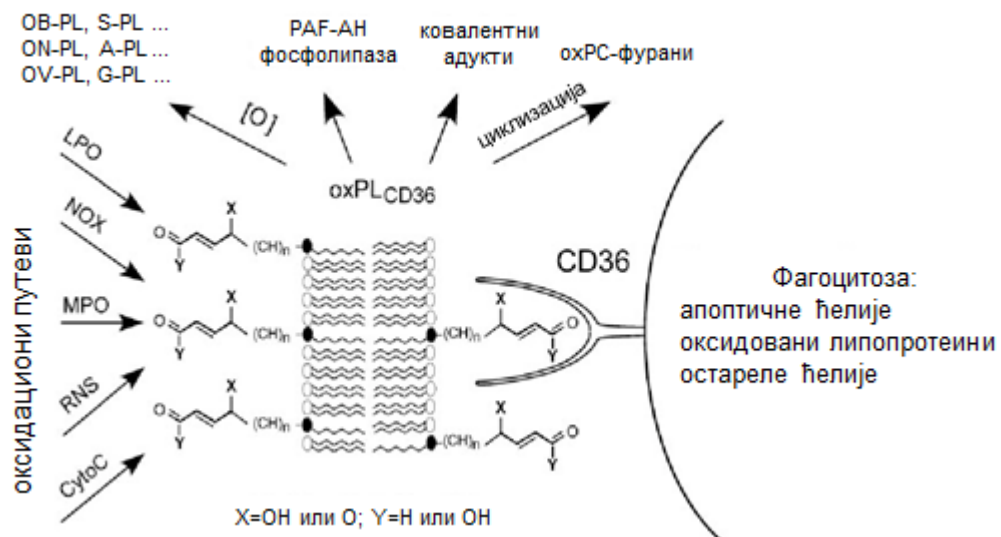
Код инфективних и инфламаторних болести људи, као најчешће промене у липидном саставу крвног серума или плазме описане су смањене концентрације HDL-холестерола и фосфолипиди и повећање концентрације триглицерида и VLDL-холестерола. Ипак, ова схема није уједначена и у великој мери зависи од узрочника и тежине болести [103, 107].

Садржај липида у крви говеда се мења са старашћу. Тек рођена телад имају ниске концентрације укупних липида у плазми, чији се значајнији пораст детектује тек треће недеље по рођењу. Код телади од рођења до трећег месеца живота главне липидне класе у плазми су холестерил-естри (41- 49%) и

фосфатидилхолин (21 до 29%), са мањим количинама других фосфолипида, триглицерида и слободних масних киселина. Главне промене у профилу липидних класа, од трећег дана до трећег месеца је повећање концентрације холестерил-естара и фосфатидилхолина, и смањење концентрације триглицерида, слободних масних киселина и фосфатидилетаноламина [110]. Промена концентрације липида код телади са респираторним болестима је анализирана у малом броју студија [15, 111, 112] а резултати већине њих су показали да се у циркулацији болесних телади повећава концентрација триглицерида, VLDL и LDL холестерола и смањује концентрација укупног холестерола као последица смањења холестерола у саставу HDL.

Механизми којим липиди регулишу имунски одговор су делимично познати. Њихови имуномодулаторни ефекти се најчешће остварују кроз утицај на ћелије имунског система променом у количини и саставу фосфолипида ћелијске мембране, променом у синтези липидних медијатора еикозаноида (простагландина, леукотријена и тромбоксантина) и формирањем липидних пероксида [113]. Последњих година показано је да велики имуномодулаторни потенцијал имају и полинезасићене масне киселине, посебно оне у серији n-3, за које је показано да делију као регулатори запаљенских процеса. Полинезасићене масне киселине серије n-3 инхибирају биосинтезу липидних медијатора, еикозаноида и синтезу њиховог прекурсора, арахидонске киселине. Ове масне киселине регулишу имунски одговор модификацијом активности транскрипционог фактора и промена експресије гена [114]. Метаболизам и садржај фосфолипида који формирају високо контролисану сигналну мрежу је од суштинског значаја за ефикасан урођени имунски одговор [115]. Оксидовани фосфолипиди ћелијске мембране или у саставу HDL представљају ендogene „*pattern recognition*“ лиганде који имају битну улогу у препознавању и фагоцитози од стране макрофага која је посредована CD36 молекулом. У састав ових оксидованих HDL улазе све анализирани молекулске врсте фосфолипида (фосфатидил холин, фосфатидил етаноламин, фосфатидил серин). Оксидовани фосфолипиди након везивања за CD36 бивају фагоцитовани, даље се оксидују што резултује унапредовалом оксидацијом и појавом скраћених молекулских форми који могу да покрену бројне сигналне путеве од значаја за регулацију имунског одговора (слика 2.6). Оксидовани фосфолипиди су супстрати

фосфолипазе A2 које селективним уклањањем *sn*-2 масних киселина посредује у ремоделовању мембрана и уклањању оксидованих фосфолипида. Група оксидационих фосфолипида су реактивне електрофилне врсте које интерагују са нуклеофилним молекулским врстама као што су остаци на протеинима и липопротеина (аминолипида). Такође група оксидационих фосфолипида, у чијем саставу се налазе докозахексаонска, арахидонска или линолеинска киселина, поседује реактивне хидроксилне групе на естерификованим масним киселинама које омогућавају интрамолекулску циклизацију и дехидратацију којим се формирају фурани који не везују CD36 и не индукују фагоцитозу али је показано да се акумулирају на месту инфламације [116, 117].



Слика 2.6. Модел потенцијалних путева који утичу на формирање и разградњу оксидованих фосфолипида који служе као високо афинитетни лиганди за рецептор CD36. CytoC- цитохром C; RNS- реактивне врсте азота; MPO- мијелопероксидазе; NOX- NAD(P)H оксидазе; LPO- липооксигеназе; PC- холин глицерофосфолипиди; PAF-AH- тромбоцитни-активациони фактор ацетилхидролазе; OB-PL, ON-PL и OV-PL- 4-оксобутерна киселина, 9-оксононајлонска киселина и 5-оксовалеријанска киселина естри 2-лизо-PC, респективно; S-PL, A-PL и G-PL, ћилибарна киселина, азелаинска киселина, и глутарна киселина естри 2-лизо-PC, респективно; oxPLCD36 -оксидовани фосфолипиди који се везују за рецептор CD36; oxPC-фуран- оксидовани фосфолипиди са *sn*-2 ацил групом која садржи терминални 2-фурил карбонил [116].

Ендогени и микробијални липиди су конституенти имунокомплекса. Код људи је промена садржаја липида у CIC најчешће изучавана и доказана у артериосклерози, инфаркту миокарда и дијабетесу [118, 119, 120]. Додатно модификовање LDL (десијализовани, гликозиловани и оксидовани LDL) активира производњу анти-LDL антитела, што доводи до формирања комплекса LDL са специфичним антителима, а CIC у чијем се саставу налазе индукују интрацелуларну акумулацију липида, депозите на ендотелним ћелијама и друге промене повезане са артериосклерозом [121]. Ниво CIC у чијем саставу се налазе и IgG и IgM, као и LDL значајно корелира са прогресијом артериосклерозе [120].

Механизми којим LDL-CIC остварују своје ефекте нису довољно познати. Оксидовани LDL-CIC макрофаг преобладајно интернализују путем Fc γ рецептора I (Fc γ RI) након чега се липидни део акумулира у ендозомалном компартману колокализаним са HSP70, а аполипопротеински део одлази у лизозоме. Сматра се да HSP70 протеини спречавају деградацију липида у саставу имунокомплекса и њихов одлазак у лизозоме. Липидна и протеинска компонента оксидованих LDL који нису у форми имунокомплекса се у макрофагима интернализују након везивања за „scavenger“ рецепторе и њихова липидна и апопротеинска компонента су колокализани и у ендозомима и у лизозомима. Сигнали које покрећу оксидовани LDL и оксидовани LDL-CIC различито утичу на медијаторе оксидативног стреса. Тако је у макрофагама стимулираним оксидованим LDL-CIC мембрански потенцијал митохондрија био већи а синтеза H₂O₂ и NO нижа него у макрофагама стимулираним слободним оксидованим LDL [122]. Оксидовани LDL у форми имунокомплекса везивањем за CD36, TLR4 и Fc γ рецепторе на дендритичним ћелијама активира инфламазома и индукује синтезу IL-1 β , при чему је она много већа него у ћелијама стимулираним слободним оксидованим LDL-ом. IL-1 β узрокује Th17 поларизацију и секрецију IL-17 [121], цитокина чија је концентрација повећана у многим инфламаторним болестима [123]. Оксидовани али и нативни LDL-IgG имунокомплекси су стимулатори мастоцита у којима индукују повећану експерсију и секрецију проартерогених цитокина, TNF- α , IL-8 и MCP-1 и секрецију преформираних медијатора хистамина и триптаза из гранулоцита. На овај начин мастоцити формирају ћелијски мост између оксидованих LDL-CIC и инфламације у артериосклерози [124]. Abdelsamie и сар. [125] су показали да оксидовани LDL-CIC, везујући се за

Fc γ RI и Fc γ RIII, али не и Fc γ RII и CD36, на мезенгијалним ћелијама активира сигналну каскаду у којој учествују p38, JNK митогеном активирани киназе и протеин киназа Ц, и која стимулише експресију колагена тип IV и додатну експресију Fc γ RI. Аутори сматрају да на овај начин LDL-CIC доприносе развоју дијабетске нефропатије.

Улога липида у саставу имунокомплекса у бронхопнеумонијама телади до сада није изучавана али индиректни докази о њиховој могућој улози у патогенези болести дају подаци о значају LPS у цистичној фибрози и у хроничној инфекцији плућа бактеријом *Pseudomonas aeruginosa*. Код ових болесника у циркулацији су нађена антитела свих изотипова специфична и за липидне и за угљенохидратне компоненте. Имунокомплекси LPS и ових антитела су нађени у спутуму. Имунокомплекси формирану *in vitro* од LPS *P. aeruginosa* и хиперимуних серума хронично инфицираних болесника са цистичном фиброзом су били потентни стимулатори, јачи од самог LPS, секреције TNF α из мононуклеарних ћелија и респираторног праска у гранулоцитима [126].

3. НАШИ РАДОВИ

У овом раду смо испитивали структурне и функционалне особине СИС изолованих из крвног серума телади старе три месеца која су оболела од благе форме бронхопнеумоније изазване бактеријом *P. multocida*, серотип А. СИС чине имунокомплекси који се формирају у плућима и који одатле лимфотоком излазе у периферну циркулацију. Иако СИС представљају само малу фракцију имунокомплекса формираних током болести, они су одговарајући модел за изучавање имунокомплекса када их није могуће изоловати директно са места инфламације.

СИС смо изоловали методом која се заснива на селективној преципитацији имунокомплекса полиетилен гликолом (PEG) високе молекулске масе. Овај метод је погодан и за изоловање и анализу састава, и за *in vitro* студије биолошких ефеката СИС [81, 127, 128, 129, 130]. PEG-ом се таложе СИС велике (>19S) и средње (8-19S) масе, али не и СИС мале масе [81]. PEG поред имунокомплекса (тј имуноглобулина агрегираних антигенима) може да таложи и друге серумске протеине [127, 128] па се овај метод у дијагностици сматра, и користи, као скрининг тест за откривање повишеног нивоа СИС [131, 132].

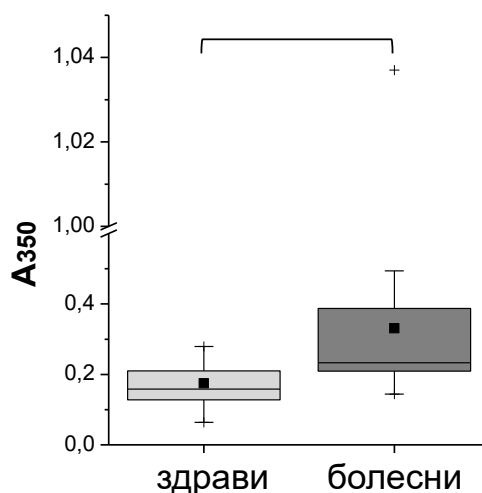
Говеђи IgG агрегирани топлотом, али не и мономерни IgG се таложе раствором 3-4% PEG-а релативне молекулске масе 6000 [78, 133, 134]. Како агрегирани IgG представљају *in vitro* модел имунокомплекса, таложење протеина серума PEG-ом се може користити за изоловање и одређивање нивоа СИС и код говеда.

Мерењем нивоа PEG преципитабилних СИС у серумима здраве телади у различитим узрастима добијен је систем референтних вредности на основу којих се може анализирати промена нивоа СИС у патолошким стањима [78, 134].

3.1 Физичко-хемијске особине PEG преципитабилних СИС телади са бронхопнеумонијом

3.1.1 Ниво СИС

Ниво СИС, изражен као A_{350} PEG преципитираних протеина крвног серума, код здраве телади је износио $0,178 \pm 0,059$ ($Me=0,171$; опсег вредности: $0,064-0,279$; CV 34%) и није се разликовао од референтних вредности A_{350} PEG преципитираних протеина серума здраве телади старе три месеца ($0,237 \pm 0,130$; $Me=0,178$; опсег вредности: $0,097-0,494$; CV 55%; [134]). У серумима телади са благом формом бронхопнеумоније која су анализирана у овој студији A_{350} PEG преципитираних протеина серума је била $0,331 \pm 0,196$ ($Me 0,245$; опсег вредности $0,144-1,037$; CV 59%). Ове вредности су биле више за 89% ($p=0,001$) у односу на вредности A_{350} PEG преципитата здраве телади (слика 3.1). Повишене вредности нивоа СИС детектоване су и у нашој ранијој студији код телади са снажном клиничком формом болести [13].



Слика 3.1. Ниво СИС телади са бронхопнеумонијом и здраве телади. Ниво СИС је изражен као A_{350} протеина серума преципитираних PEGом. Средња вредност (■); медијана (линија унутар хистограма); опсег од 25% до 75% вредности (правоугаоник); највероватније вредности унутар скупа (граничници); распон од минималне до максималне вредности (+). Хоризонтална линија: статистички значајна разлика у вредности A_{350} здраве и болесне телади.

Вредности A_{350} PEG преципитата нису корелирале са концентрацијама укупних протеина, γ глобулина серума детектованих електрофорезом у гелу агарозе и протеинске фракције молекулске масе од 150-160 kDa детектоване нередукуюћом SDS-PAGE (види у 4.3.6.1 и 4.3.6.2). Вредности коефицијената корелације (r_s) за укупне протеине, γ глобулине и фракцију од 150-160 kDa су биле: 0,16 ($p=0,4$), 0,23 ($p=0,2$) и 0,17 ($p=0,3$). Одсуство корелације између нивоа СИС и концентрације серумских γ глобулина смо детектовали раније, код телади са тежом клиничком формом болести [13]. Mellencamp и сар. [83] су показали да ни код људи са бактеријском, пнеумококном пнеумонијом није постојала корелација између концентрације серумских IgG и нивоа СИС. Овакви резултати нам индиректно потврђују да се у PEG тесту, као и у тестовима који су користили други аутори [83], не преципитирају мономерни серумски IgG, јер би у том случају постојала позитивна корелација између концентрација IgG у серумима и нивоа имунокомплекса.

3.1.2 Величина СИС и величина конституената СИС

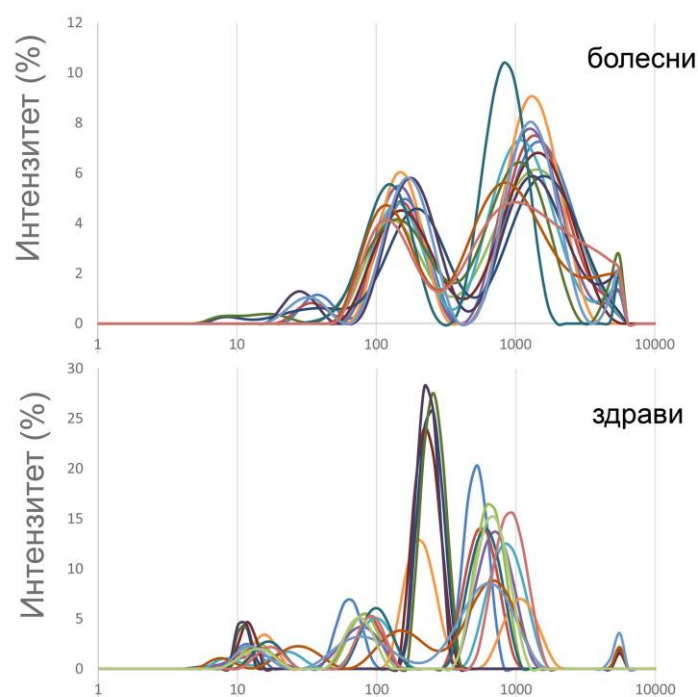
Величине СИС и величина конституената тј. честица које улазе у састав СИС су анализирани проточном цитометријом и фотон корелационом спектроскопијом [135].

Величина СИС болесне телади, изражена као средња вредност FSC вредности, је износила 242 ($Me=198$; $Ge=117$) и била је нешто већа од величина СИС здраве телади ($x=228$; $Me=189$; $Ge=112$).

Графици расподеле зависности интензитета расуте светлости од хидродинамичког дијаметра честица збирних узорака СИС показују да је расподела честица СИС болесне телади била униформнија у односу на СИС здраве телади (слика 3.2). У СИС болесне телади се на основу хидродинамичког дијаметра издваја пет група честица: I) 11 ± 4 nm; II) 35 ± 4 nm; III) 162 ± 34 nm; IV) 1426 ± 291 nm и V) 5211 ± 509 nm. Највећи удео расуте светлости (51-75%) је био последица расипања о честице IV групе, и на основу тога је закључено да су честице дијаметра 1426 ± 291 nm главни конституенти СИС болесне телади (табела

3.1). У СИС здраве телади детектовано је пет група честица: I) 14 ± 5 nm; II) 85 ± 12 nm; III) 225 ± 33 nm; IV) 734 ± 174 nm и V) 5560 ± 509 nm, од којих се како главне издвајају честице величине 225 ± 33 nm (25-92% расуте светлости) и 734 ± 174 nm (33-72% расуте светлости) (табела 3.2).

У СИС обе групе телади интензитет расуте светлости о честице које по хидродинамичком радијусу одговарају мономерима IgG говеда (у нашим резултатима I група честица; 11,2 nm по [136]) и неспецифично агрегираним честицама (честице веће од 5000 nm, V група) је био низак.



Слика 3.2. Хидродинамички дијаметар конституената СИС телади са бронхопнеумонијом и здраве телади: појединачне генеричке криве.

3.1.3 Зета потенцијал СИС

Измерена вредност зета потенцијала СИС болесне телади је била $-12,1\pm 1,7$ mV (Ме = $-12,4$ mV; опсег: $-8,60$ до $-14,90$ mV). Код здраве телади ова вредност је износила $-11,38\pm 0,78$ mV (Ме = $-11,4$ mV; опсег: $-9,94$ до $-13,00$ mV). Разлика између средњих вредности зета потенцијала здраве и болесне телади била је на граници значајности ($p=0,049$).

Табела 3.1. Величина конституената СИС здраве телади.

Максимум расипања светлости										
број	I		II		III		IV		V	
	d (nm)	%	d (nm)	%	d (nm)	%	d (nm)	%	d (nm)	%
1	9	3	64	24	248	91	524	68	5560	5
2	8	4	85	27	259	92	581	64	5560	2
3	12	12	82	22	210	56	658	68	5560	2
4	13	11	101	25	233	88	615	65	5560	2
5	14	10	76	20	234	89	692	71	5560	2
6	17	10	87	24	167	25	649	62		
7	14	9	79	22			692	69		
8	13	8	93	19			731	72		
9	13	9	101	23			932	64		
10	17	8					880	33		
11	23	8					1113	58		
12	11	9								
13	11	8								
14	16	11								
15	12	10								
16	11	9								
17	29	12								
\bar{x}	14	9	85	23	225	73	734	63	5560	2
SD	5	2	12	2	33	27	174	11	0	1
mediana	13	9	85	23	234	89	692	65	5560	2
Min	8	3	64	19	167	25	524	33	5560	2
Max	29	12	101	27	259	92	1113	72	5560	5
CV (%)	36	27	14	10	15	37	24	17	0	53

број: број снимака у којима су детектоване честице одређеног дијаметра; d (nm) – хидродинамички дијаметар честице;
% - удео честица одређеног дијаметра у укупном расипању светлости.

Табела 3.2. Величина конституената СИС телади са бронхопнеумонијом.

Максимуми расипања светлости										
број	I		II		III		IV		V	
	d (nm)	%	d (nm)	%	d (nm)	%	d (nm)	%	d (nm)	%
1	9	1	32	4	212	39	1871	56	5559	5
2	9	1	41	2	157	36	1078	56	5560	4
3	16	2	30	5	168	31	1170	64	5560	3
4			37	5	196	39	1631	51	5559	4
5			33	4	157	31	1690	62	4953	3
6					176	36	1375	55	4705	5
7					154	32	1642	68	4261	9
8					156	35	1444	65	5531	2
9					175	36	1595	64		
10					143	29	1754	71		
11					157	35	1448	62		
12					152	32	1268	63		
13					138	33	1115	58		
14					125	37	881	61		
\bar{x}	11	1	35	4	162	34	1426	61	5211	4
SD	4	1	4	1	23	3	291	5	509	2
mediana	9	1	33	4	157	35	1446	62	5545	4
min	9	1	30	2	125	29	881	51	4261	2
max	16	2	41	5	212	39	1871	71	5560	9
CV (%)	36	43	13	31	14	9	20	9	10	53

број: број снимака у којима су детектоване честице одређеног дијаметра; d (nm) – хидродинамички дијаметар честице;
% - удео честица одређеног дијаметра у укупном расипању светлости.

3.1.4 Протеини крвног серума и СИС

Концентрација укупних протеина крвног серума болесне телади је износила 70 ± 12 g/L и била је за 11% већа од концентрације протеина крвног серума здраве телади. PEG-ом је преципитирано $2,9 \pm 0,4\%$ (Me=3,0%; опсег 2,0-3,5%) протеина серума болесне телади и $3,2 \pm 0,6\%$ (Me=3,1%; опсег 2,1-4,2%) протеина серума здраве телади. Концентрација протеина у СИС болесне и здраве телади је износила $2,0 \pm 0,5$ g/L (Me=2,0 g/L; опсег 1,4-3,9%) и $2,0 \pm 0,3$ g/L (Me=1,9 g/L; опсег 1,9-2,7%).

Протеински састав СИС и серума телади је анализиран електрофорезом у гелу агарозе, SDS-PAGE и нативном PAGE. Како је имунски одговор у говеђим пастерелозама посредован антителима IgG класе [21] највећа пажња је била усмерена на анализу фракција у којима се налазе IgG и коју представља главни изотип имуноглобулина у серумима телади [137].

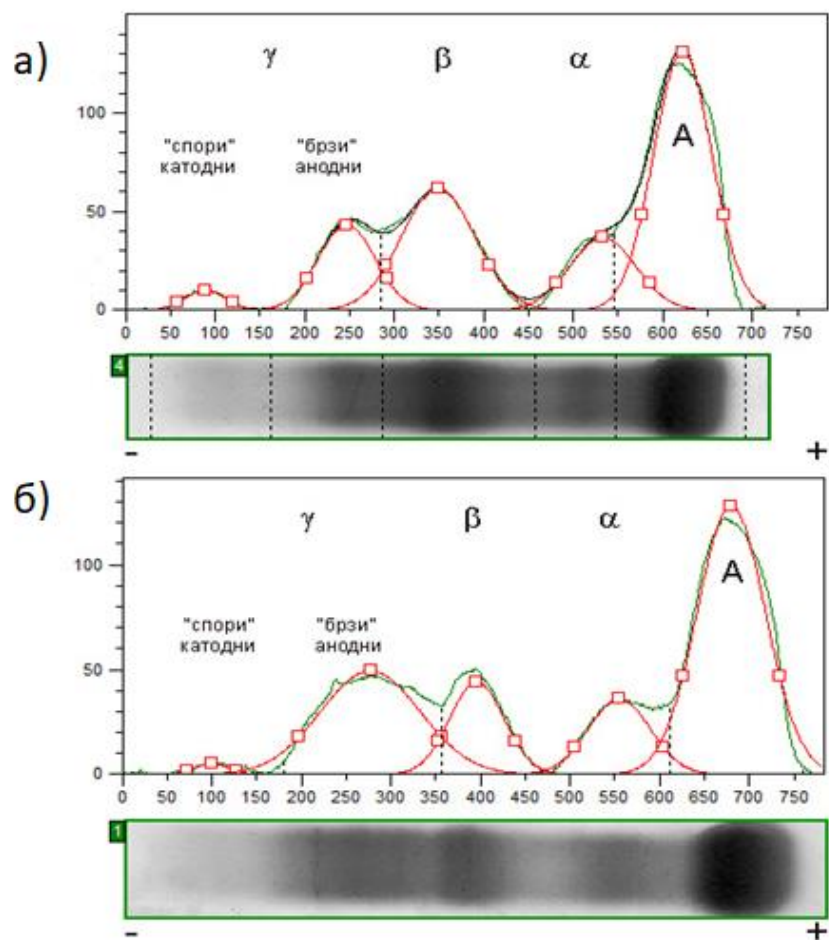
3.1.4.1 Анализа протеина крвног серума и СИС електрофорезом у гелу агарозе

Електрофорезом у гелу агарозе протеини крвних серума и здраве и болесне телади се раздвајају у четири фракције: γ , β и α глобулине, и албумине (слика 3.3) које су присутне и у серумима одраслих говеда [60, 134, 138]. Код болесне телади није запажена промена хомогености ни једне од фракција. Дензитометријском анализом електрофорегарама протеина крвних серума нису уочене разлике у релативној концентрацији (%) електрофоретских фракција серума здраве и болесне телади. У серумима болесне телади је детектован пораст апсолутне концентрације укупних протеина, концентрације γ (предоминантно молекули IgG; [60, 139]) од 23% и α глобулина (међу којима се налазе неки од протеина акутне фазе, [140]) од 56% (табела 3.3). Повећана концентрација γ и α глобулина у серумима телади са бронхопнеумонијом је била у складу са нашим ранијим налазима и налазима других истраживачких група [3, 17, 82].

У складу са претходним резултатима [46, 60] након раздвајања протеина серума телета у гелу агарозе γ глобулини садрже предоминантно IgG формирају

широко електрофоретско поље у којем се уочавају две делимично суперпониране субфракције, спорих, катодних и бржих анодних. Концентрација спорих γ глобулина, (предоминантно IgG2, [59]) била нижа, што је у складу са резултатима који говоре да се у серумима телади старе три месеца налазе све молекулске (имунохемијске) варијанте које постоје код одраслих говеда али да је концентрација спорих γ глобулина нижа него код одраслих говеда [60, 138]. Поред интактних IgG, брзи γ глобулини у себи садрже и Fc протеолитичке фрагменте IgG(1), док се F(ab)₂ фрагменти накупљају у фракцији спорих γ глобулина [141].

Разлике у релативној заступљености (%) фракција спорих и бржих γ глобулина између здраве и болесне телади није било. Међутим, детектован је пораст у апсолутној концентрацији бржих γ глобулина од 25%. Овакав резултат показује да је пораст у апсолутној концентрацији γ глобулина у серумима болесне телади био резултат пораста концентрације фракције бржих γ глобулина који у себи предоминантно садрже IgG1. IgG1 се код говеда синтетишу као део неинфламаторног Th2 одговора. Усмеравање у правцу Th2 одговора које је карактеристично за све младе животиње [142] може се тумачити као механизам заштите младих организама од развоја снажне запаљенске реакције током које неминовно долази до ослобађања великог броја аутоантигена што би код младог организма са незрелим имунским одговором могло да доведе до развоја аутоимунских феномена. Код говеда, повећана синтеза γ глобулина тј. IgG1 може да буде и протективни механизам јер су код говеда IgG1 главни имуноглобулини мукозних површина [56]. Vukotić [60] објашњава да иако је одсуство IgG2 код телади у првим данима живота и одложена синтеза у односу IgG1 физиолошка појава у онтогенези имуноглобулинског система говеда, она може да буде и чинилац у настанку и развоју неких инфекција код телади. Говеда која немају IgG2 или имају нижи титар ове подкласе су подложнија пнеумонијама и другим „гнојним“ инфекцијама, а у пнеумонијама које су експериментално индуковане бактеријом *Haemophilus somnus*, повећан титар IgG2 у бронхоалвеоларној течности корелира са нестанком бактерија [58]. Иако повећање титра IgG1 и IgA предходи повећању титра IgG2, уклањање бактерија се дешава тек када се концентрација IgG2 повећа.



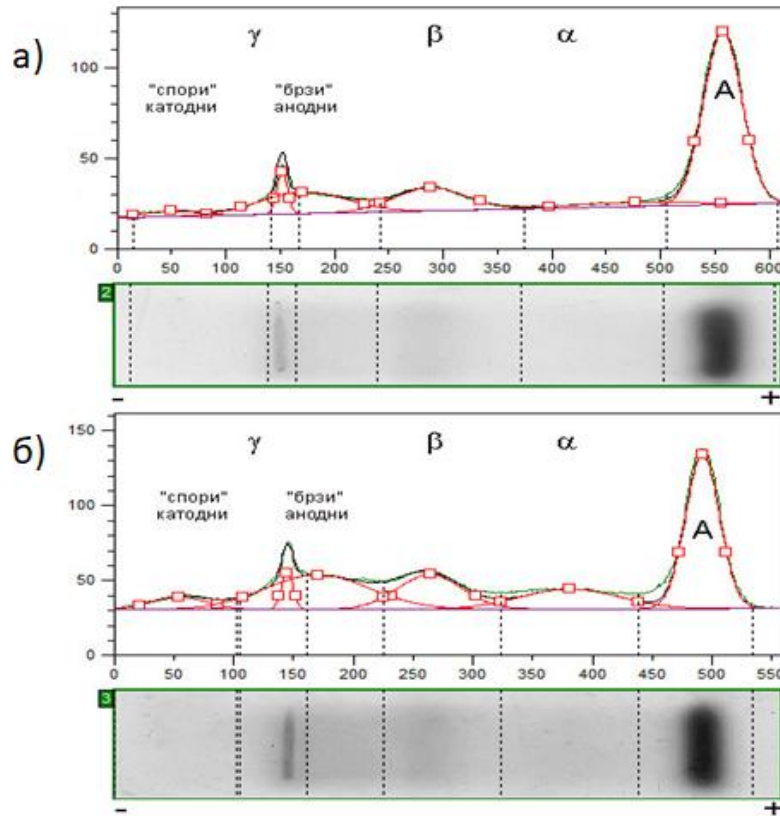
Слика 3.3. Електрофореза протеина серума здраве (а) и болесне (б) телади у гелу агарозе. А: албумин, α , β и γ глобулини. Зелена линија: Интензитет боје детектован дензитометријом. Црвена линија: деконволузија пикова делимично суперпонираних електрофоретских фракција.

Табела 3.3. Електрофореза у гелу агарозе протеина серума телади са бронхопнеумонијом и здраве телади: Релативна и апсолутна концентрација главних електрофоретских фракција.

		здрави	болесни	
Укупни Протеини	g/L	63 ± 10	70 ± 12*	*11% ↑
		63 (48 - 80)	65 (60 - 111)	
Укупни γ глобулини	%	20 ± 3	22 ± 6	
		19 (16 - 28)	24 (12 - 30)	
	g/L	13 ± 4	16 ± 5*	* 23% ↑
		11 (8 - 21)	17 (7 - 29)	
Спори, катодни γ глобулини	%#	15 ± 12	11 ± 14	
		11 (2 - 39)	6 (1 - 54)	
	g/L	2 ± 2	2 ± 4	
		1 (1 - 6)	1 (1 - 19)	
Брзи, анодни γ глобулини	%#	85 ± 12	89 ± 14	
		89 (61 - 98)	94 (48 - 99)	
	g/L	11 ± 4	13 ± 4*	* 25% ↑
		10 (4 - 18)	15 (7 - 19)	
β глобулини	%	14 ± 5	13 ± 5	
		14 (8 - 24)	15 (3 - 18)	
	g/L	9 ± 4	9 ± 3	
		8 (4 - 17)	10 (2 - 14)	
α глобулини	%	7 ± 3	9 ± 4	
		8 (1 - 11)	10 (3 - 15)	
	g/L	4 ± 2	6 ± 3*	* 56% ↑
		5 (1 - 7)	7 (2 - 11)	
Албумин	%	60 ± 6	56 ± 11	
		62 (47 - 67)	52 (42 - 77)	
	g/L	37 ± 6	40 ± 11	
		37 (28 - 52)	39 (28 - 73)	

%; релативна заступљеност фракције у укупним протеинима; %#: релативна заступљеност спорих и брзих γ глобулина у укупним γ глобулинима. Приказани су средња вредност ± стандардна девијација, медијана (коса слова) и опсег од најмање до највеће вредности (у заграда). (*) статистички значајна разлика између здраве и болесне телади (p<0,05); ↑ проценат пораста концентрације код болесне телади.

Електрофорезом у гелу агарозе и протеини СИС болесне и здраве телади су се раздвајали у четири фракције: γ , β и α глобулине, и албумине (слика 3.4).



Слика 3.4. Електрофореза протеина СИС здраве (а) и болесне (б) телади у гелу агарозе. А: албумин, α , β и γ глобулини. Зелена линија: Интензитет боје детектован дензитометријом. Црвена линија: деконволузија пикова делимично супепонираних електрофоретских фракција.

У СИС болесне телади детектовано је повећање апсолутне концентрације γ и α глобулина за 22% и 70% (табела 3.4). Као и у фракцији γ глобулина протеина серума, у фракцији γ глобулина СИС уочавају се преобладајућа фракција брзих, анодних γ и мање заступљена фракција спорих катодних γ глобулина. Тачна концентрација ове две субфракције, а можда целе фракције γ глобулина, није могла бити одређена због тога што је део материјала који је остајао депонован на месту постављања онемогућавао прецизну дензитометријску анализу.

РЕГ је таложио $2,9 \pm 0,9\%$ ($Me=2,7\%$ опсег 0,7-5,1%) γ глобулина серума болесне телади и $3,4 \pm 1,4\%$ ($Me=2,7\%$ опсег 1,3-7,5%) γ глобулина серума здраве телади. У нашим ранијим студијама [13, 17] смо показали да је и код телади са

тежим формама бронхопнеумоније РЕГ таложио ниске проценте серумских γ глобулина.

Табела 3.4. Електрофореза у гелу агарозе протеина С1С телади са бронхопнеумонијом и здраве телади: Релативна и апсолутна концентрација главних електрофоретских фракција.

		здрави	болесни	
Укупни	g/L	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,5	
		1,9	2,0	
Протеини		(1,5 - 2,7)	(1,4 - 3,9)	
γ глобулини	%	21 ± 7	23 ± 10	
		19	21	
		(14 - 41)	(12 - 56)	
	g/L	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,4*	22% ↑
		0,4	0,4	
		(0,3 - 1,0)	(0,2 - 2,1)	
β глобулини	%	13 ± 3	16 ± 3*	17% ↑
		13	16	
		(6 - 19)	(10 - 21)	
	g/L	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	
		0,2	0,3	
		(0,1 - 0,4)	(0,2 - 0,4)	
α глобулини	%	3 ± 2	6 ± 3*	70% ↑
		3	6	
		(1 - 6)	(2 - 13)	
	g/L	0,06 ± 0,03	0,11 ± 0,06*	75% ↑
		0,06	0,11	
		(0,02 - 0,1)	(0,03 - 0,24)	
Албумин	%	63 ± 6	57 ± 7	
		64	60	
		(44 - 67)	(40 - 68)	
	g/L	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,2	
		1,2	1,1	
		(1,0 - 1,8)	(0,8 - 1,4)	

%: релативна заступљеност фракције у укупним протеинима. Приказани су средња вредност ± стандардна девијација, медијана (коса слова) и опсег од најмање до највеће вредности (у загради). (*) статистички значајна разлика између здраве и болесне телади; проценат пораста ↑ или смањења ↓ концентрације код болесне у односу на здраву телад.

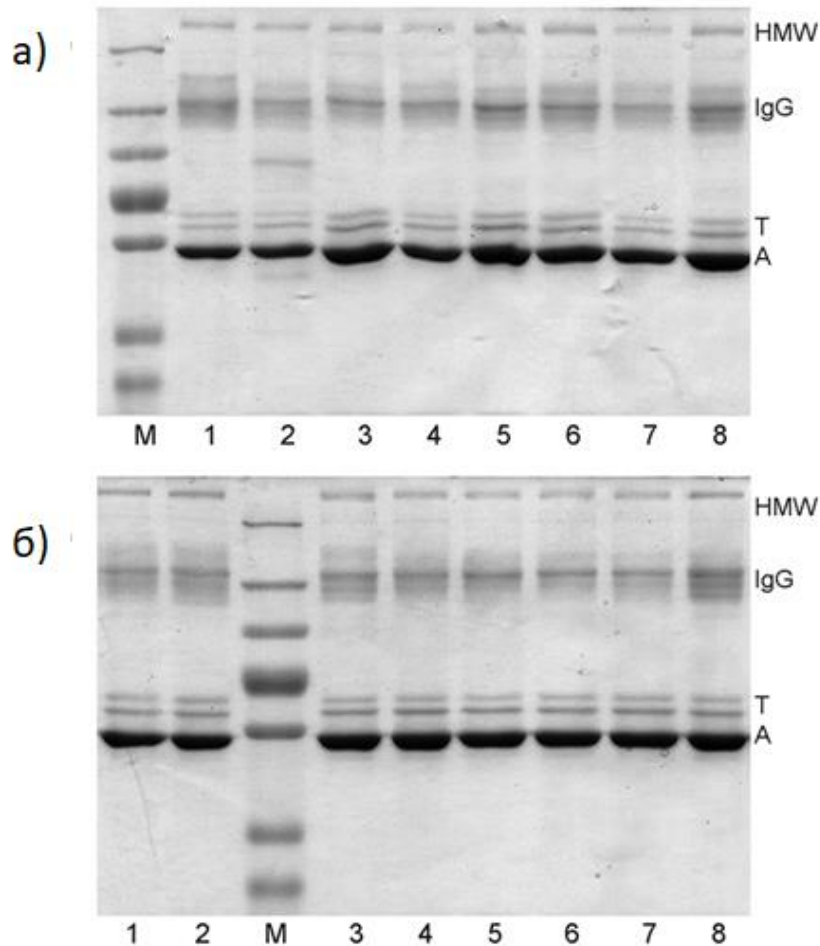
3.1.4.2 Анализа протеина серума и CIC PAGE

SDS-PAGE у нередукујућим условима протеини крвног серума здраве телади и телади са бронхопнеумонијом се раздвајају на четири главне електрофоретске фракције: 1) протеине молекулске масе веће од 160 kDa (енгл. *high molecular weight proteins*, HMW) које код говеда садрже IgA, IgM и неке од протеина акутне фазе [8, 14, 143]; 2) протеине молекулске масе од 150-160 kDa. Како IgA у серуму говеда постоје само у форми димера (300 kDa) [143] у овој фракцији се налази IgG; 3) две протеинске фракције које по молекулским масама од 78 и 72 kDa одговарају главним молекулским варијантама говеђег трансферина [144]; 4) протеинску фракцију која по молекулској маси од 66 kDa одговара говеђем албумину [145] (слика 3.5).

Дензитометријском анализом електрофореграма одређена је релативна и израчуната апсолутна концентрација протеина у главним електрофоретским фракцијама (табела 3.5). Концентрација IgG код болесне телади је била за 24% већа у односу на здраву телад. Концентрација IgG и њено повећање у серумима болесне телади је корелирало са концентрацијом γ глобулина одређеном електрофорезом у гелу агарозе ($r_s=0,6$; $p<0,001$). Фракција од 150-160 kDa није била електрофоретски хомогена већ се састојала од три или четири делимично суперпониране субфракције. За ове фракције сматрамо да представљају различите молекулске варијанте IgG (изотипове, алотипове, гликоформе и IgG са различитим дужинама CDRH3) [13, 47, 49, 50, 67, 68, 146]. Прецизна квантификација субфракција унутар IgG није била могућа због веома мале разлике у њиховој електрофоретској покретљивости.

У серумима болесне телади детектован је и пораст концентрације HMW протеина и трансферина, док је концентрација албумина била непромењена. Пораст концентрације HMW протеина може да указује на повећану синтезу IgA и IgM неких од протина акутне фазе [8, 14] али су потребне даље анализе да би се ови протеини идентификовали. Сматра се да повећана концентрација трансферина указује на дефицит гвожђа које се јавља у инфекцијама [147]. Међутим, како код телади укључених у ову студију анемија није примећена (табела 4.1) сматрамо да је пораст концентрације трансферина адаптивни механизам који се развио у одговору на присуство грам негативне *P. multocida*.

Ellison и сар. [148] су показали да (апо)трансферин, делујући као хелатор двовалентних катјона, ослобађа LPS и нарушава стабилност спољашње мембране грам негативних бактерија што за последицу има промену пермеабилности и повећану осетљивост на дејство литичких агенаса.



Слика 3.5. Протеини крвних серума здраве (а) и болесне (б) телади. SDS-PAGE у нередукујућим условима: 8% гел за раздвајање; количина протеина 5 μ g; бојење: СВВ. HMW: протеини молекулске масе веће од 160 kDa; T: трансферин,; A: албумин; M: протеински маркери молекулских маса од 240, 160, 122, 87, 68, 47 и 36 kDa.

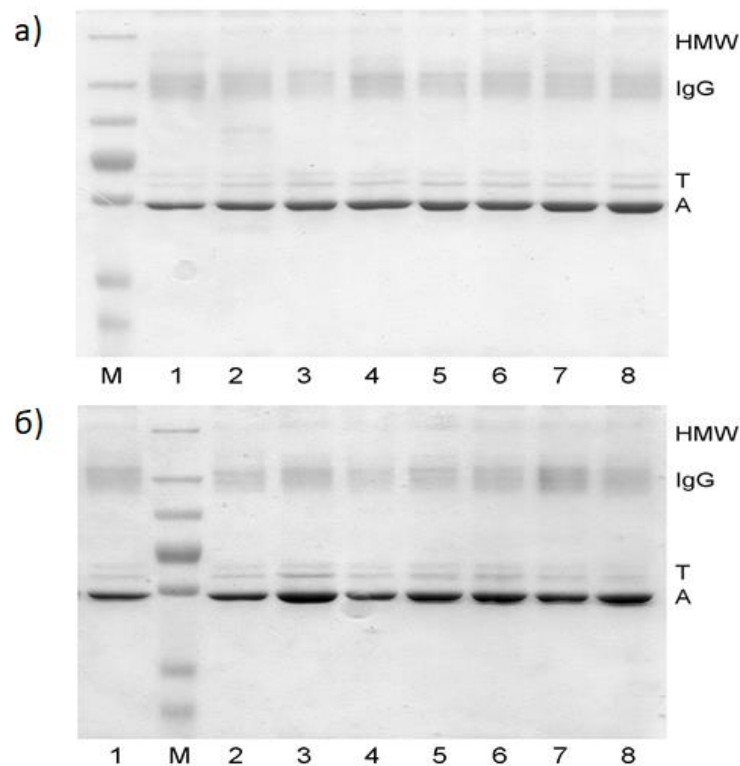
Табела 3.5. Релативна и апсолутна концентрација главних електрофоретских фракција протеина крвних серума телади са бронхопнеумонијом и здраве телади: SDS-PAGE у нередукуюћим условима.

		здрави	болесни	
Укупни Протеини	g/L	63 ± 10	70 ± 12*	11% ↑
		63	65	
		(48 - 80)	(60 - 111)	
HMW (>160 kDa)	%	5 ± 4	9 ± 7	69% ↑
		4	8	
		(1 - 16)	(1 - 20)	
	g/L	3 ± 3	6 ± 4*	79% ↑
		3	5	
		(1 - 11)	(1 - 15)	
IgG (150-160 kDa)	%	24 ± 6	28 ± 5	
		23	28	
		(15 - 40)	(11 - 37)	
	g/L	15 ± 5	19 ± 4*	24% ↑
		14	19	
		(9 - 24)	(8 - 30)	
Трансферин (78 и 72 kDa)	%	7 ± 3	12 ± 4	17% ↑
		7	12	
		(4 - 13)	(4 - 17)	
	g/L	5 ± 2	8 ± 3	12% ↑
		3	8	
		(2 - 10)	(2 - 12)	
Албумин (66 kDa)	%	58 ± 12	46 ± 16	21% ↓
		60	45	
		(38 - 74)	(27 - 78)	
	g/L	36 ± 8	32 ± 12	
		36	33	
		(24 - 46)	(17 - 54)	

%; релативна заступљеност фракције у укупним протеинима. Приказани су средња вредност ± стандардна девијација, медијана (коса слова) и опсег од најмање до највеће вредности (у загради). (*) статистички значајна разлика између здраве и болесне телади; Процент пораста ↑ или смањења ↓ концентрације код болесне телади. HMW: протеини молекулске масе веће од 160 kDa.

SDS-PAGE у нередукујућим условима и протеини С1С болесне телади се раздвајају у исте четири фракције: протеине велике молекулске масе, IgG, трансферин и албумин (слика 3.6). Разлике у релативној и апсолутној концентрацији ових фракција између здраве и болесне телади нису детектоване (табела 3.6).

Ни код здраве ни код болесне телади PEG није у истом проценту преципитирао протеине различитих електрофоретских фракција. Када су анализиране исте фракције код здраве и болесне телади уочено је да PEG преципитира мањи проценат серумских HMW и IgG, и већи проценат албумина код здраве телади у односу на болесну телад (табела 3.7).



Слика 3.6. Протеини С1С здраве (а) и болесне (б) телади. SDS-PAGE у нередукујућим условима: 8% гел за раздвајање; количина протеина 5μg; бојење: СВВ. HMW: протеини молекулске масе веће од 160 kDa; Т: трансферин; А: албумин; М: протеински маркери молекулске масе од 240, 160, 122, 87, 68, 47 и 36 kDa.

Табела 3.6. Релативна и апсолутна концентрација главних електрофоретских фракција протеина С1С телади са бронхопнеумонијом и здраве телади: SDS-PAGE у нередуюјућим условима.

		здрави	болесни
Укупни Протеини	g/L	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,5
		1,9 (1,5 - 2,7)	2,0 (1,4 - 3,9)
HMW (>160 kDa)	%	3 ± 2	4 ± 2
		2 (1 - 6)	3 (2 - 6)
	g/L	0,07 ± 0,03	0,06 ± 0,04
		0,06 (0,05 - 0,15)	0,05 (0,02 - 0,15)
IgG (150-160 kDa)	%	32 ± 6	34 ± 9
		32 (20 - 45)	35 (22 - 62)
	g/L	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,4
		0,6 (0,4 - 1,0)	0,6 (0,3 - 2,4)
Трансферин (78 и 72 kDa)	%	9 ± 3	10 ± 2
		9 (5 - 14)	11 (5 - 13)
	g/L	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
		0,1 (0,1 - 0,4)	0,2 (0,1 - 0,4)
Албумин (66 kDa)	%	53 ± 7	52 ± 9
		54 (40 - 64)	51 (29 - 64)
	g/L	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
		1,1 (0,7 - 1,4)	1,0 (0,7 - 1,5)

‰: релативна заступљеност фракције у укупним протеинима. Приказани су средња вредност ± стандардна девијација, медијана (коса слова) и опсег од најмање до највеће вредности (у загради). HMW: протеини молекулске масе веће од 160 kDa.

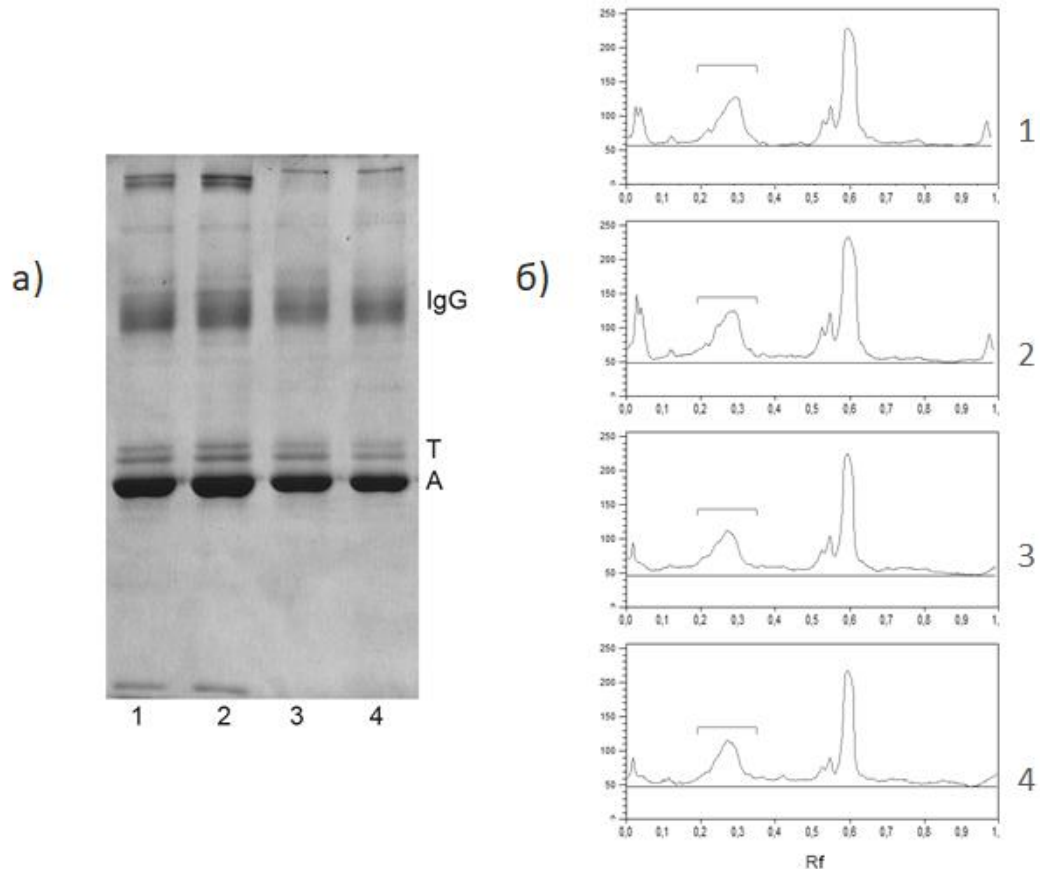
Табела 3.7. SDS-PAGE у нередукујућим условима. Процент укупних протеина крвног серума и проценат главних протеинских фракција серума здраве телади и телади са бронхопнеумонијом преципитиран 3,75% PEG-ом.

% преципитираних протеина крвног серума			
	здрави	болесни	
Укупни	3,2 ± 0,6	2,9 ± 0,9	
Протеини	3,1 (2,1 - 4,2)	2,7 (0,7 - 5,1)	
HMW (> 160 kDa)	3,0 ± 1,9 2,3 (0,4 - 7,1)	1,6 ± 1,3* 1,0 (0,4 - 6,4)	49%↓
IgG (150-160 kDa)	4,4 ± 1,5 4,3 (2,5 - 7,7)	3,5 ± 1,2# 3,3 (1,9 - 7,1)	30%↓
Трансферин (78 и 72 kDa)	4,7 ± 3,0 3,9 (1,4 - 11,9)	3,5 ± 1,9 3,4 (1,2 - 9,1)	
Албумин (66 kDa)	3,0 ± 0,7 2,9 (1,5 - 4,2)	3,9 ± 1,8* 3,6 (1,3 - 7,4)	31%↑
разлика у % преципитираних протеина (p)			
	здрави	болесни	
HMW vs IgG	0,005	< 0,001	
HMW vs трфансферин	0,05	0,007	
HMW vs албумин	0,9	0,01	
IgG vs трансферин	0,6	0,1	
IgG vs албумин	0,009	0,3	
трансферин vs албумин	0,06	0,1	

Приказани су средња вредност ± стандардна девијација, медијана (коса слова) и опсег од најмање до највеће вредности (у загради). (*) статистички значајна разлика између здраве и болесне телади, $p < 0,05$; (#) разлика близу статистички значајне, $p = 0,06$; Процент пораста ↑ или смањења ↓ количине преципитираних протеина код болесне у односу на здраву телад. HMW: протеини молекулске масе веће од 160 kDa.

Да би се смањио утицај велике индивидуалне варијабилност у електрофоретској покретљивости различитих форми IgG припремљени су збирни узорци серума и СИС. У IgG фракцији збирних узорака серума и СИС здраве и болесне телади налазиле су се две слабије фракције веће молекулске масе и једна интензивна фракција мање молекулске масе (слика 3.7). Постојање две

субфракције IgG (једне интензивније и једне слабије) у збирним узорцима серума и СИС телади исте старости описала је Fratrić [134]. Прецизна дензитометријска квантификација суперпонираних фракција у нашим узорцима и узорцима које је анализирао Fratrić [134] није била могућа.



Слика 3.7. Протеини збирних узорка серума и СИС здраве и болесне телади; Узорци: 1- серум здраве телади, 2- серум болесне телади, 3- СИС здраве телади, 4- СИС болесне телади. а) SDS-PAGE у нередукуюћим условима: 8% гел за раздвајање; количина протеина 15 μ g; бојење: СВВ. Т: трансферин, А: албумин; б) Дензитометријски запис електрофореграма. Хоризонтална линија означава фракцију IgG.

3.1.4.3 Анализа IgG из крвног серума и СИС телади

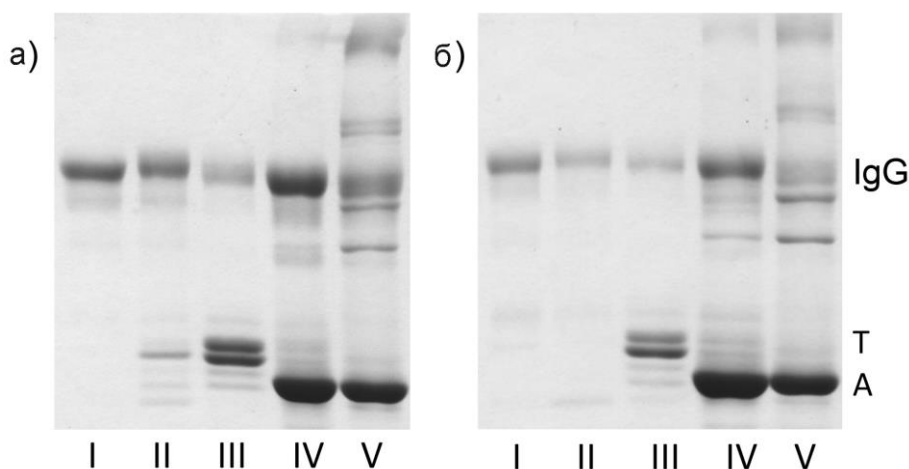
Сматра се да у инфективним болестима у састав СИС улази мала фракција имуноглобулина специфична за антиген [79, 83, 149, 150] чији изотипски састав

и гликозилациони профил може да буде различит у односу на укупне имуноглобулине серума [151, 152]. С обзиром да се код телади IgG у саставу имунокомплекса по својим физичкохемијским и имунохемијским особинама разликују од слободних/неагрегираних IgG молекула у циркулацији и да су и IgG молекули у циркулацији изузетно хетерогени [60] паралелно смо испитивали укупни IgG у нефракционисаним серумима, у фракцијама серума обогаћеним у садржају IgG а које су добијене риванолском преципитацијом и ањонском јоноизмењивачком хроматографијом, и фракцији која садржи имунокомплексе а издвојена је из серума таложењем PEG-ом. Након анализе SDS-PAGE, из свих наведених узорака су изоловани IgG афинитетном хроматографијом на протеин А и протеин G матриксу.

3.1.4.3.1 IgG крвног серума телади изоловани јоноизмењивачком хроматографијом

IgG серума телади су фракционисани ањонском хроматографијом на Q Sepharose Fast Flow јоноизмењивачу. Као стартни пуфер за еквилибрацију матрикса и уклањање протеина који се нису везивали за матрикс коришћен је 20 mM TRIS пуферу, pH 7,3. Протеини везани за матрикс су елуирани изократски 20 mM TRIS пуфером, pH 7,3 са додатком 50, 100 и 200 mM NaCl. SDS-PAGE анализом протеина серума фракционисаних ањонском хроматографијом на Q Sepharose Fast Flow јоноизмењивачу уочено је да су серумски IgG телади имали широку хроматографску дистрибуцију и налазили су се у фракцији која се није везивала за јоноизмењивач и у свим фракцијама које су елуиране дисконтинуланим повећањем концентрације NaCl (слика 3.8). Примећено је да IgG изоловани у различитим фракцијама имају различиту електрофоретску покретљивост, односно молекулску масу. Молекулска маса благо расте од прве ка другој фракцији, а затим опада ка петој. Дензитометријском анализом површина фракција од 150-160 kDa показано је да се $17\pm 2\%$ IgG молекула није везивало за ањонски измењивач, да је $15\pm 2\%$ елуирано пуфером са 50 mM NaCl, $16\pm 3\%$ пуфером са 100 mM NaCl, $28\pm 4\%$ пуфером са 200 mM NaCl и $24\pm 3\%$

молекула IgG је било снажно везано за јоноизмењивачки матрикс и елуирано је 2M NaCl.

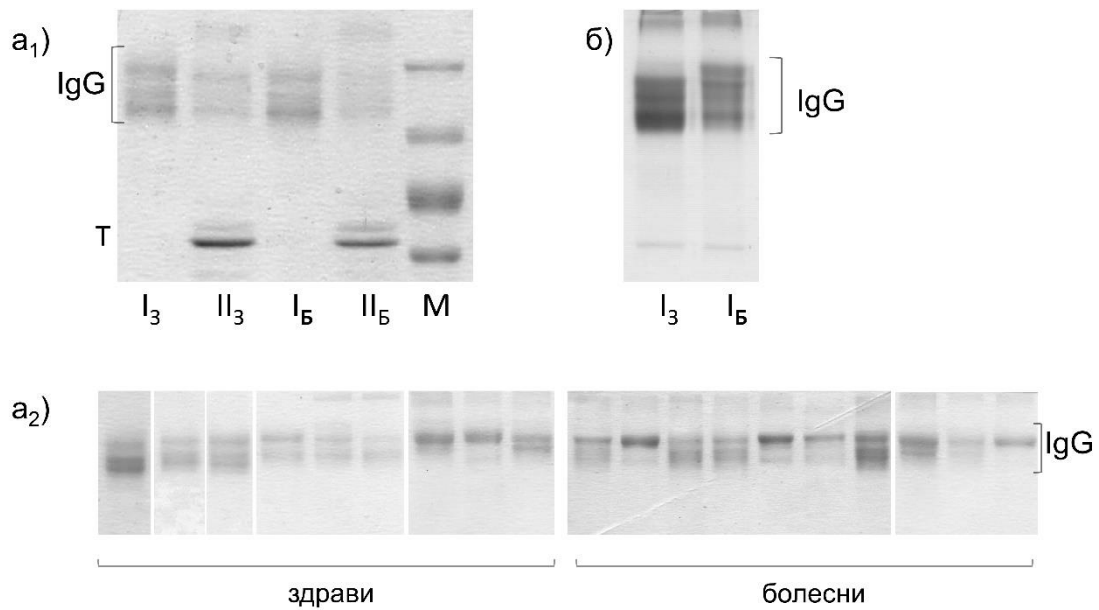


Слика 3.8. Фракционисање протеина серума здравог телета (а) и телета са бронхопнеумонијом (б) на Q Sepharose Fast Flow јоноизмењивачком матриксу. SDS-PAGE у нередукуюћим условима: 6% гел за раздвајање; количина протеина: 3 μ g; бојење СВВ; I протеини који се не везују за матрикс (узорак пре преципитације ацетоном); II протеини елуирани 20 mM TRIS + 50 mM NaCl; III протеини елуирани 20 mM TRIS + 100 mM NaCl; IV протеини елуирани 20 mM TRIS + 200 mM NaCl, V протеини елуирани 2M NaCl. Т: трансферин; А албумин.

IgG су изоловани у све четири хроматографске фракције, али само у I фракцији нису били значајно контаминирани другим протеинима серума. У овој фракцији 90-95% протеина су чинили IgG. Из 0,5 mL серума болесне телад у фракцији протеина који се нису везивали за Q Sepharose Fast Flow јоноизмењивачком матриксу изоловано је $0,7\pm 0,2$ mg IgG (Me=0,7 mg; опсег вредности 0,4-0,9 mg) и ова количина се није разликовала од количине IgG изоловане из серума здраве телад ($0,7\pm 0,4$ mg IgG; Me=0,7 mg; опсег вредности 0,2-1,6 mg). Принос, тј. проценат од укупних серумских IgG изолованих у овој фракцији је за здраву телад био $11\pm 3\%$ (медијана: 11%; опсег вредности 4-15%) што је било значајно више ($p=0,001$) од приноса регистрованог код болесне телад ($6\pm 3\%$; медијана: 6%; опсег вредности 2-9%).

IgG изоловани у првој хроматографској фракцији нису били електрофоретски хомогени већ су се у SDS-PAGE раздвојили на неколико субфракција (слика 3.9). Због великих индивидуалних варијација резултати

дензитометријске квантификације субфракција у појединачним узорцима није могла бити урађена прецизно. Међутим, у збирним узорцима унутар ове фракције јасно се уочавају 4 субфракције чија количина код здраве и болесне телади није била једнака (слика 3.9). Повећана количина IgG веће молекулске масе (највероватније IgG1) код болесне телади је у складу са резултатима електрофорезе у гелу агарозе којом је показано да је концентрација брзих γ глобулина (предоминантно IgG1) била повишена у серумима болесне телади.



Слика 3.9. Фракционисање протеина серума здраве телади и телади са бронхопнеумонијом на Q Sepharose Fast Flow јоноизмењивачком матриксу: а₁) **појединачни узорци** серумских протеина здравог (З) и болесног (Б) телета; I хроматографска фракција - протеини који се не везују за јоноизмењивачки матрикс; II хроматографска фракција - протеини елуирани 20 mM TRIS + 50 mM NaCl. а₂) **појединачни узорци** протеина I хроматографске фракције. б) **збирни узорци** протеина хроматографске фракције здраве (З) и болесне (Б) телади; збирни узорци преципитирани ацетоном. SDS-PAGE у нередукујућим условима: 8% гел за раздвајање; Количина протеина: а₁) 3 μ g, протеини нису преципитирани ацетоном; а₂) 10 μ g протеина; б) 10 μ g; бојење СВВ; Т: трансферин. М: протеински маркери молекулске масе од 160, 122, 87 и 68 kDa.

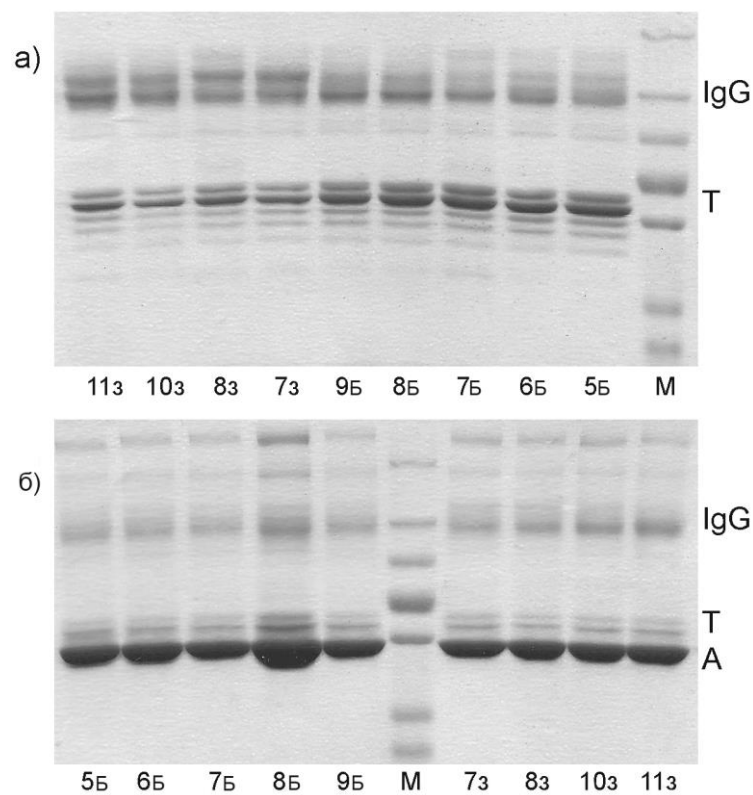
Широка хроматографска расподела серумских IgG одраслих говеда и телади је описана и раније [46, 60]. Vukotić [60] је показао да се анјонском

измењивачком хроматографијом на DEAE Sephadex-у, полазећи од стартног 20 mM натријум фосфатног пуфера pH 8,0 и применом линеарног градијента елуције ка 370 mM натријум фосфатном пуферу pH 4,0, протеини серума раздвајају на три фракције: I пик) IgG2/ имунохемијске варијанте IgG2a и IgG2b; II пик) IgG1 и IgG2/ имунохемијске варијанте IgG1a, IgG1b и IgG2c; III пик) IgG1 и IgG2/ имунохемијска варијанта IgG1b и IgG2c. Иако ове резултате није могуће директно упоредити са нашим резултатима јер су коришћени различити ањонски измењивачи који сами по себи имају велики утицај на изоловање одређених молекулских форми IgG [46, 153], различити пуферски системи, начин елуције и аналитичке технике (имуноелектрофореза vs SDS-PAGE) у обе хроматографије се у I хроматографској фракцији изолују скоро потпуно пречишћени. На основу електрофоретске покретљивости (молекулске масе) изолованог IgG ми смо закључили да се у нашим изолатима у I хроматографској фракцији изолују обе изотипске форме IgG, док је Vukotić [60] имунохемијски доказао присуство само IgG2. Vukotić [60] је као стартни пуфер користио пуфер pH 8,0 на коме су због своје ниже pI вредности IgG1 и IgG2b позитивно наелектрисани, док су IgG2a или негативни или су електронеутрални и не везују се за матрикс [46]. У нашим експериментима хроматографија је рађена у TRIS пуферу pH 7,3. На овој вредности pH обе поткласе IgG садрже електронеутралне или електропозитивне молекулске форме које се не везују за ањонски измењивач.

3.1.4.3.2 IgG крвног серума телади изоловани риванолском преципитацијом

Протеини серума одраслих говеда се након таложења риванолом раздвајају на риванол-солубилну и риванол-преципитабилну фракцију. У обе ове фракције налазе се и IgG1 и IgG2 али ни једна од њих не садржи све молекулске варијанте IgG [60]. У супернатанту, након додатног пречишћавања таложењем амонијум сулфатом, идентификоване су електрофоретски најспорије варијанте IgG1 и IgG2 које се имунохемијски идентификују као IgG1a, IgG2a и IgG2b док је бржи IgG2c био присутан само у траговима. У риванолском талогу, након додатног пречишћавања таложењем амонијум сулфатом и каприлном киселином идентификовани су електрофоретски бржи IgG, IgG2c и IgG1b [60].

Наши резултати су показали да се у серуму телади старе три месеца налазе и риванол-солубилни и риванол-преципитабилни IgG (слика 3.10). У даљем раду ми смо детаљније анализирали особине риванол-солубилних IgG јер су они изоловани у релативно пречишћеној форми тј. са трансферином као главним контаминантом. Особине риванол-преципитабилних IgG нису детаљније анализирани јер су они били контаминирани великим бројем серумских протеина. За уклањање ових контаминаната било је потребно применити додатне кораке у пречишћавању што је довело до великих губитака IgG.



Слика 3.10. Фракционисање протеина серума здраве телади (З) и телади са бронхопнеумонијом (Б) риванолском преципитацијом: а) риванол-солубилни протеини, б) риванол-преципитабилни протеини. SDS-PAGE у нередукујућим условима: 8% гел за раздвајање; количина протеина: а) 10 μ g, б) 3 μ g, пре преципитације ацетоном; бојење СВВ; Т: трансферин; А: албумин; М: протеински маркери молекулских маса од 240, 160, 122, 87, 68, 47 и 36 kDa. Бројеви означавају редни број телета у документацији аутора.

Релативни удео (%), концентрација и количина изолованих риванол-солубилних IgG код здраве и болесне телади се нису разликовале. Међутим принос, тј. проценат од укупних серумских IgG изолован у овој фракцији је за

здрави телад био значајно виши ($p=0,002$) од приноса код болесне телади (табела 3.8).

Табела 3.8. Релативни садржај, концентрација, количина и принос IgG у фракцији риванол-солубилних протеина крвног серума телади са бронхопнеумонијом и здраве телади.

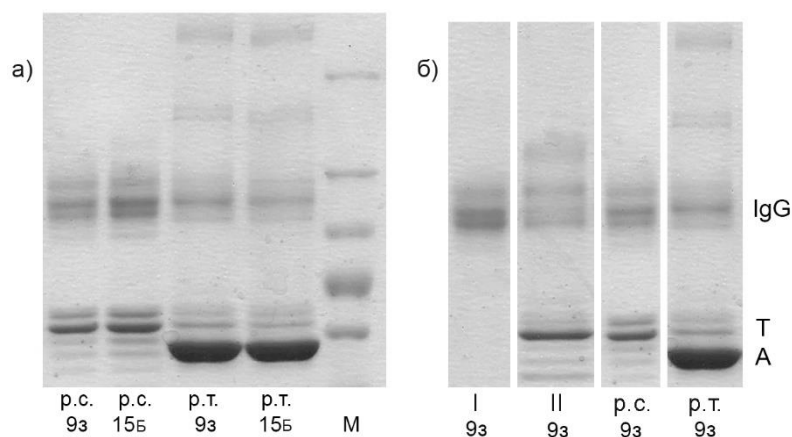
	IgG %	IgG mg/mL	IgG mg	IgG принос (%)
Риванол-солубилни протеини				
Здрави	50 ± 8 53 (31-59)	1,9 ± 0,4 2,0 (0,9-2,6)	1,0 ± 0,3 1,0 (0,4-1,3)	30 ± 10 31 (17-33)
Болесни	45 ± 9 44 (34-52)	1,7 ± 0,6 1,5 (1,1-1,7)	0,8 ± 0,3 0,8 (0,5-0,9)	15 ± 5* 15 (11-16)

IgG (%): релативна заступљеност IgG; IgG (mg): количина IgG; IgG принос (%): проценат од количине IgG у 0,25 mL нефракционисаног серума. Приказани су средња вредност ± стандардна девијација, медијана (коса слова) и опсег од најмање до највеће вредности (у загради). (*) статистички значајна разлика између здраве и болесне телади.

Ни риванол-солубилни, ни риванол-преципитабилни IgG нису били електрофоретски хомогени. Риванол-солубилни протеини IgG су се раздвајали на три субфракције, а риванол-преципитабилни IgG су се у 2/3 узорака раздвајали на три, а у 1/3 узорака на две субфракције (слика 3.10). Удео субфракција у појединачним узорцима риванол-солубилних IgG здраве и болесне телади није био различит. У субфракцији најмање Rf вредности налазило се 19±13% IgG и код здраве и код болесне телади. У нешто бржој фракцији средње Rf вредности код здраве и болесне талади налазило се 43±7% и 36±5% IgG. У фракцији највеће покретљивости код здраве и болесне талади налазило се 37±11% и 45±16% IgG.

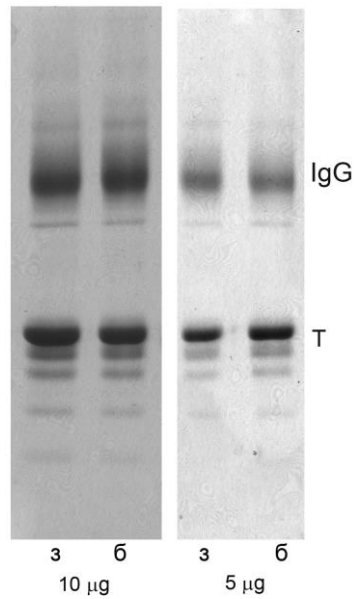
Када су на истом гелу раздвојени узорци риванол-солубилних и риванол-преципитабилних протеина као и протеини изолованих у I и II хроматографској фракцији пореклом из једног телета (слике 3.11) видело се да постоје разлике у покретљивости и релативној заступљености субфракција IgG у различитим изолатима IgG, што је показало да се јоноизмењивачком хроматографијом и

риванолском преципитацијом или не изолују идентичне молекулске форме или се ове форме не изолују у истој количини.

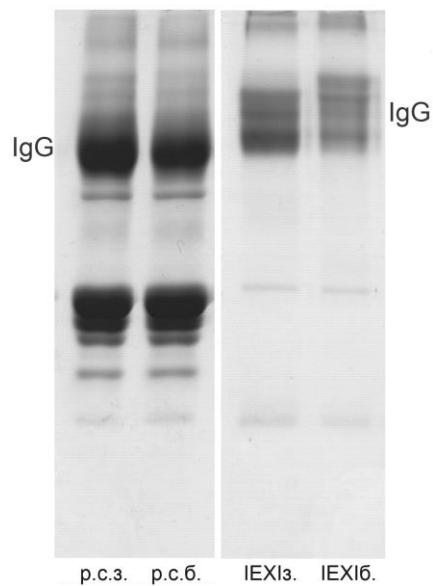


Слика 3.11. Фракционисање протеина серума здравог телета риванолском преципитацијом (а) и јоноизмењивачком хроматографијом на ањонском измењивачком матриксу Q Sepharose Fast Flow (б). р.с.: риванол-солубилни протеини; р.т.: риванол-преципитабилни протеини, I: протеини који се не везују за јоноизмењивачки матрикс; II: протеини елуирани 20 mM TRIS + 50 mM NaCl. SDS-PAGE у нередукуюћим условима: 8% гел за раздвајање; количина протеина: 10 μ g; бојење СБВ; Т: трансферин; А албумин; М: протеински маркери молекулских маса од 240, 160, 122, 87 и 68 kDa. Број означава редни број здравог (з) и болесног (б) телета у документацији аутора.

У риванол-солубилним протеинима и здраве и болесне телади у зони која по молекулској маси одговара говеђим IgG детектоване су три електрофоретске фракције од којих је најинтензивнија била фракција са највећом вредности Rf (слика 3.12а,б). Значајна разлика у заступљености фракција IgG у риванол-солубилним протеинима код здраве и болесне телади није детектована. С обзиром да су у појединачним узорцима две фракције са мањом Rf вредности чиниле 80% IgG желели смо да проверимо да ли се ова интензивна фракција у збирним узорцима заправо састоји од две субфракције. Анализом гела на коме је раздвајана двоструко мања количина протеина (слика 3.12а) потврдили смо да то није случај, већ да ова фракција вероватно настаје суперпонирањем већег броја фракција мале разлике у електрофоретској покретљивост. Нижа молекулска маса IgG у овој масивној субфракцији је у складу са подацима да је IgG2 доминантан изотип IgG у риванол-солубилним протеинима [60].

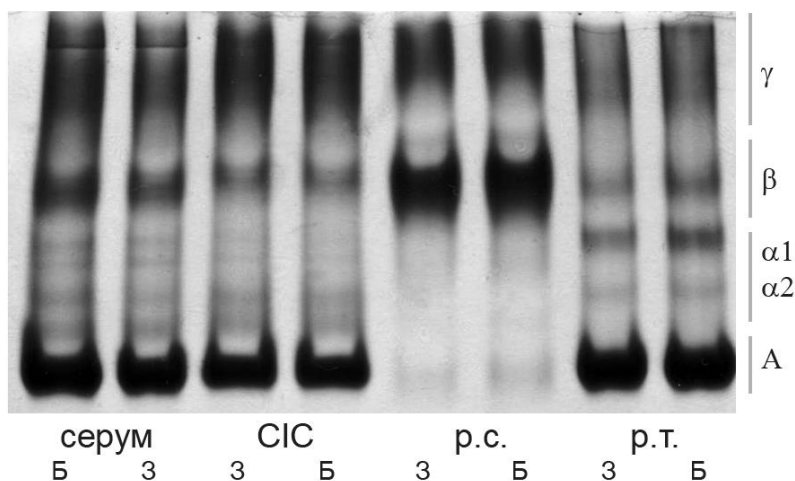


Слика 3.12а. Збирни узорци риванол-солубилних протеина серума здраве телади (з) и телади са бронхопнеумонијом (б). SDS PAGE у нередукујућим условима: 8% гел за раздвајање; количина протеина: 10 µg и 5 µg; бојење СВВ.



Слика 3.12б. Поређење електрофоретских карактеристика различитих изолата IgG серума здраве (з) и телади са бронхопнеумонијом (б). Збирни узорци риванол-солубилних (р.с.) и протеина изолованих јоноизмењивачком хроматографијом (I пик: IEXI). SDS-PAGE у нередукујућим условима: 8% гел за раздвајање; количина протеина 10 µg; бојење СВВ.

Концентрација протеина у риванол-солубилним узорцима је била ниска, и није се могла анализирати електрофорезом у гелу агарозе којом се може раздвојити до 5 μ L серума. Нативном PAGE показали смо да се у узорцима риванол-солубилних протеина заиста налазе „спори“ IgG, преобладајуће IgG2 (слика 3.13).



Слика 3.13. Нативна SDS-PAGE збирних узорака серума, C1C, риванол-солибилних (р.с.) и риванол-преципитабилних (р.т.) протеина серума здраве телади (З) и телади са бронхопнеумонијом (Б); 8% гел за раздвајање; количина протеина: 25 μ g; бојење СВВ. А – албумин; $\alpha 1$, $\alpha 2$, β и γ глобулини.

Број и релативна заступљеност фракција у збирним узорцима риванол-солубилних протеина серума здраве и болесне телади није била једнака оним у збирним узорцима протеина серума изолованих анјонском хроматографијом (слике 3.12а, 3.12б, табела 3.9.) У серумским IgG изолованим јоноизмењивачком хроматографијом детектоване су четири фракције од којих су две по својој електрофоретској покретљивости одговарале субфракцијама већих молекулских маса риванол-солубилних IgG. У овим изолатима највећа разлика између здраве и болесне телади постојала је на нивоу фракције са најмањом вредности Rf (тј. са највећом молекулском масом). Ова фракција је била 6,25 пута више заступљена код болесне у односу на здраву телад и сматрамо да је њено повећање највероватније последица повећаног садржаја IgG1 (брзих γ глобулина) у серумима болесне телади.

Табела 3.9. Релативни садржај IgG у субфракцијама серума здраве телади и телади са бронхопнеумонијом. IgG парцијално пречишћени риванолском преципитацијом и ањонском измењивачком хроматографијом: збирни узорци.

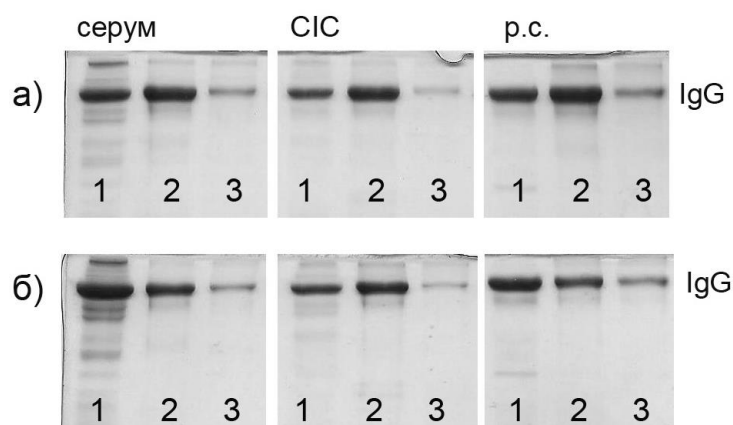
	р.с.		IEX	
	здрави	болесни	здрави	болесни
IgG (%)	51	48	92	90
IgG (mg/mL)	1,9	2,2	0,2	0,2
% IgG фракција				
фракција 1	3	3	4	25
фракција 2	6	8	23	17
фракција 3	/	/	26	22
фракција 4	91	89	47	36

Резултати дензитометријске анализе гелова на слици 3.12б. р.с.: риванол-солубилни протеини серума; IEX: протеини изоловани јоноизмењивачком хроматографијом.

3.1.4.3.3 IgG крвног серума и СИС здраве телади и телади са бронхопнеумонијом изоловани афинитетном хроматографијом

Афинитетном хроматографијом на протеин G и протеин A *Denabeads* матриксу изоловани су IgG из збирних узорака нефракционисаних крвних серума, СИС, риванол-солубилних протеина серума и протеина серума изолованих ањонском хроматографијом. Протеин G високим афинитетом везује обе подкласе говеђих IgG [154]. Иако се уопштено сматра да протеин A високим афинитетом везује само IgG2 постоје подаци који показују да протеин A везује и одређене молекулске форме IgG1, које чине и до 10% укупних серумских IgG1 [155, 156]. Schmitt и сар. [157] су показали да селективно везивање говеђих IgG2 за протеин A постоји само у условима када је рН вредност пуфера нижа од 7,8 а концентрација јона мања од 200 mM. Због тога су протеини у узорцима из којих смо изоловали IgG преведени у пуфер (150 mM PBS, рН 7,2-7,4 или 50 mM TRIS, рН 7,3) који су омогућавали диференцијално раздвајање IgG1 и IgG2 афинитетним изоловањем на протеину A.

SDS-PAGE у нередукујућим условима и CBV бојењем је показано да се у свим изолатима налази фракција која има исту електрофоретску покретљивост као и фракција IgG у непречишћеним узорцима (слика 3.14).



Слика 3.14. IgG из серума, CIC и риванол-солубилних протеина серума здраве телади (а) и телади са бронхопнеумонијом (б) афинитетно изоловани на протеин G и протеин A Dynabeads матриксу. SDS-PAGE у нередукујућим условима: 1) збирни узорци серума, CIC и риванол-солубилних протеина серума (p.c), количина протеина: 10 μ g; 2) изолати на протеину G, 30 μ L; 3) изолати на протеину A, 30 μ L; 12% гел за раздвајање; бојење СБВ.

Прецизнија анализа IgG изолата је рађена бојењем протеина сребром након раздвајања SDS-PAGE у нередукујућим условима (слике 3.15, табеле 3.10 и 3.11) и редукујућим условима (слика 3.16; табеле 3.12 и 3.13).

SDS-PAGE у нередукујућим условима је показала да је у свим изолатима била присутна масивна протеинска фракција молекулске масе од 160 kDa, која по молекулској маси одговара говеђим IgG [42, 46]. Садржај укупних IgG (IgG изоловани на протеину G) код болесне телади је био, у односу на здраву телад, или благо повишен (серум и риванол-солубилни протеини серума) или непромењен (и IgG добијеним јоноизмењивачком хроматографијом). Садржај IgG2 (IgG изоловани на протеину A) је био благо повишен у серумима и CIC, непромењен у риванол-солубилним протеинима и смањен у IgG добијеним јоноизмењивачком хроматографијом.

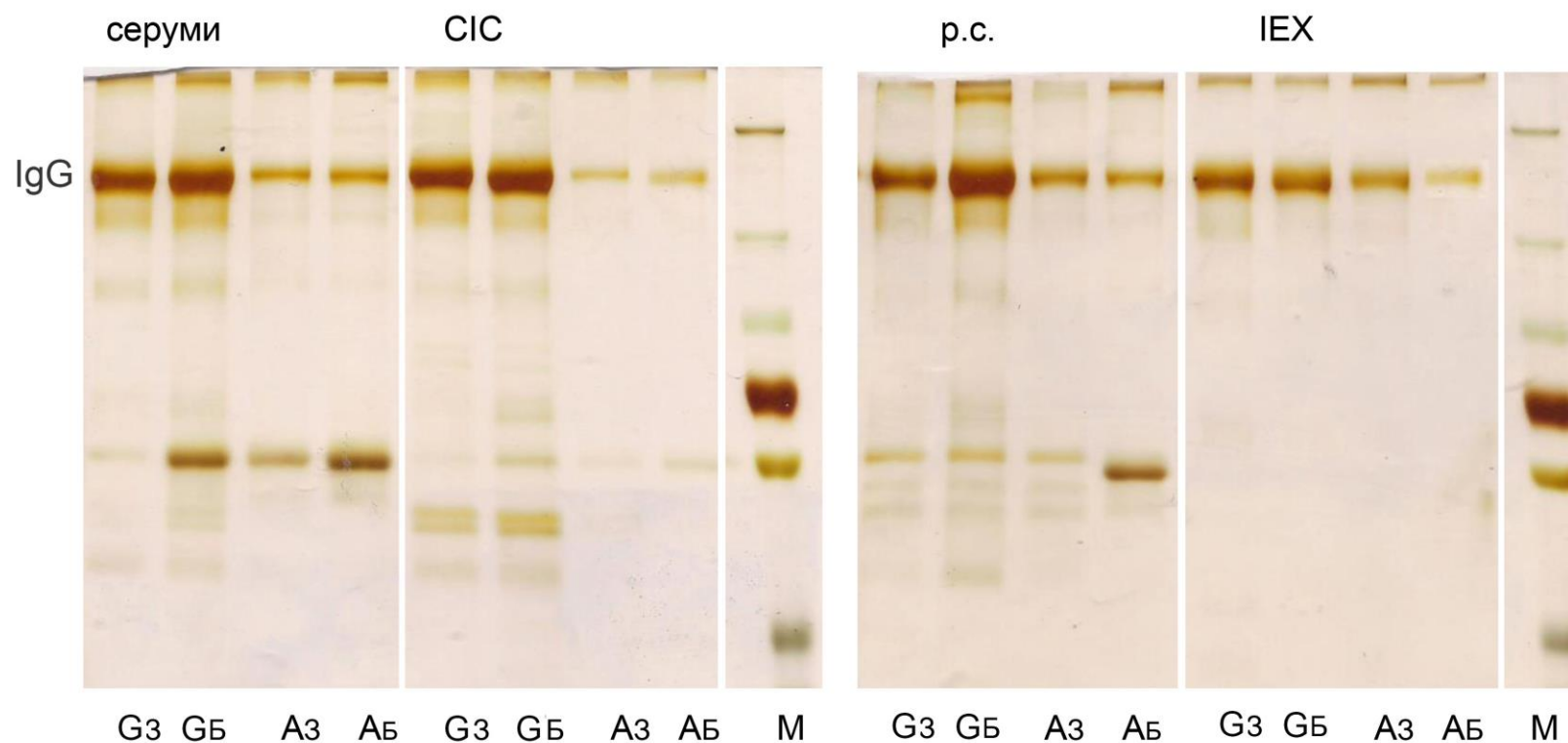
На основу односа количине IgG изолованих на протеину G и протеину A израчунато је да је садржај IgG2, и код здраве и код болесне телади, био најмањи у узорцима CIC. Смањен садржај IgG2 у CIC би могао да се доведе у везу са смањеним садржајем у серумима телади [60] и смањеним капацитетом IgG2 да формирају CIC [138].

Са IgG су копреципитирали и неки од протеина молекулских маса већих од 250 и 200 kDa, и протеини молекулских маса од 145, 100, 78, 73, 64, 62, 52, 46, 44 и 40 kDa. Број и интензитет ових фракција се разликовао у IgG изолатима на протеину G и протеину A и у IgG изолатима здраве и болесне телади. Само у изолатима IgG из CIC на протеину G детектоване су фракције (слабог интензитета) од 78 и 73 kDa. У овим изолатима су, за разлику од осталих изолата, фракције од 46 и 44 kDa биле доста интензивне.

Фракција од 52 kDa је била присутна у свим изолатима осим у изолатима IgG који су добијени јоноизмењивачком хроматографијом. Ова фракција је била интензивнија у изолатима болесне телади, а нарочито је била интензивна у изолатима укупних серумских протеина на протеину G и протеину A и изолату риванол-солубилних протеина на протеину A. По својој молекулској маси она одговара слободним γ тешким ланцима IgG. Повећано присуство слободних γ тешких ланца код болесне телади би могло да буде резултат повећане разградње IgG металопротезама *P. multocida* [37, 38, 39] или ендогеним металопротезама које телад синтетишу локално и системски [14, 18]. Чињеница да је ова фракција израженија у изолатима укупних протеина серума и риванол-солубилних протеина серума добијених на протину A могла би да укаже да је код болесне телади активност протеаза усмерена ка IgG2 изотипу. Познато је да екстраћелијске протеазе *P. multocida* разграђују IgG и IgA, али не и IgM [37]. Lee и Shewen [158] су показали да један од узрочника бронхопнеумоније телади бактерија *M. haemolytica*, серотип A1, секретује специфичне протеазе које потпуно хидролизују IgG1 до фрагмената од 39, 12 и 7 kDa. Ове протеазе не делују на IgM и IgA и само парцијално хидролизују IgG2 при чему је резултат хидролизе фрагмент молекулске масе од 30 kDa. Селективна разградња IgG2 протеазама које синтетишу узрочници бронхопнеумоније није до сада описана али би била од значаја за вируленцију јер би довела до елиминације протективних IgG2. IgG2 имају краћи регион зглоба [46] и због тога се сматрају мање осетљивим на протеолитичку разградњу. Међутим, протеазе *P. multocida*, за које је показано да за разлику од других бактеријских протеаза хидролизују хумане IgG и IgA изван региона зглоба [37], могле би на овај начин да хидролизују и говеђе IgG2. На основу односа количине слободних γ тешких ланаца који су изоловани на протеину G и протеину A израчунато је да је садржај протеин A везујућих

слободних γ тешких ланаца био значајно повећан (14 пута) у изолатима риванол-солубилних протеина болесне телади. Ово је указало да су или осетљиви на протеолизу, или се његови фрагменти, код болесне телади акумулирају у овој фракцији. Релативни удео слободних тешких ланаца пореклом од IgG2 је био виши у СИС него у серумима и код здравих и код болесних животиња. Када су упоређене здраве и болесне животиње показано је да релативни удео слободних тешких ланаца пореклом од IgG2 у серумима и СИС код болесних животиња је био нижи.

За остале протеине који су изоловани заједно са IgG не можемо без специфичних имунохемијских анализа да знамо да ли се ради о неком од протеина спољашње мембране *P. multocida* (молекулске масе су дате у [32]) или неке од интактних или деградованих протеина комплекса (молекулске масе су дате у [159]) или других протеина серума. Такође, не знамо да ли они копреципитирају са IgG као резултат специфичне реакције варијабилних региона IgG са антигенима, специфичне реакције са Fc деловима IgG или је њихова копреципитација са IgG резултат неспецифичне интеракције.



Слика 3.15. SDS-PAGE у нередукујућим условима: IgG афинитетно изоловани на протеин G и протеин A Dynabeads матриксу из збирних узорака серума, C1C, риванол солубилних протеина серума (p.c.) и протеина серума изолованих анјонском измењивачком хроматографијом (IEX) здраве телади (З) и телади са бронхопнеумонијом (Б). Количина узорка 30 μ L; 8% гел за раздвајање; бојење сребром. М: протеински маркери молекулских маса од 170, 130, 82, 64, 49, 37, и 26 kDa.

Табела 3.10. Молекулска маса протеинских фракција изолата на протеин G и протеин A Dynabeads афинитетном матриксу збирних узорака серума, СИС, риванол-солубилних протеина серума и протеина серума изолованих анјонском измењивачком хроматографијом здраве телади и телади са бронхопнеумонијом: SDS-PAGE у нередукујућим условима.

Серум				СИС				р.с.				ИЕХ				
З	Б	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б	
G	G	A	A	G	G	A	A	G	G	A	A	G	G	A	A	
> 250																
> 200																
160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	IgG
145	145	145	145	145	145			145	145	145	145	145	145			
100	100	100	100	100	100			100	100			100				
				78	78											
				73	73											
64	64			64	64			64	64			64				
	62			62	62											
52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52					Hu
46	46			46	46			46	46	46	46					
44	44			44	44			44	44	44	44					
40	40	40		40	40				40							

З – здрава телади; Б – телади са бронхопнеумонијом; G – изолати на протеин G афинитетном матриксу; А – изолати на протеин А афинитетном матриксу; р.с. – риванол-солубилни протеини серума; ИЕХ - протеини серума изоловани јоноизмењивачком хроматографијом.

Табела 3.11. Промена садржаја интактних IgG, и слободних тешких ланаца изолованих на протеин G и протеин A Dynabeads матриксу из збирних узорака серума, CIC, риванол-солубилних протеина серума (p.c.) и протеина серума изолованих анјонском измењивачком хроматографијом (IEX) здраве телади и телади са бронхопнеумонијом: SDS-PAGE у нередукујућим условима.

	IgG			H γ		
	количина			количина		
	З	Б	↑/↓	З	Б	↑/↓
серум G	474	540	1.1	40	261	6.5
A	175	215	1.2	188	318	1.7
CIC G	531	520	1.0	25	56	2.2
A	75	88	1.2	23	43	1.9
p.c. G	612	865	1.4	25	15	0.6
A	240	251	1.0	31	263	8.6
IEX G	403	412	1.0	/	/	
A	245	191	0.8	/	/	
	G/A					
	З	Б	↑/↓ [#]	З	Б	↑/↓ [#]
Серум	2.7	2.5	1.1	0.2	0.8	0.3
CIC	7.1	5.9	1.2	1.1	1.3	0.8
p.c.	2.6	3.4	0.7	0.8	0.1	14
IEX	1.6	2.2	0.8			

Количина IgG и тешких ланаца (H γ) је одређена дензитометријски и представља површину пика одговарајуће фракције. Вредност изражена као број пиксела/1000. ↑/↓: промена у садржају код болесне телади. Вредност представља количник површина пика IgG или H γ болесне и здраве телади.

G/A: релативни удео IgG2 у IgG изолованих на протеину G и протеину A. ↑/↓[#]: промена у количини протеин A везујућих IgG и H γ болесне телади. Исказана је као реципрочна вредност G/A односа болесне и здраве телади

SDS-PAGE у редукујућим условима је показала да су се у свим изолатима налазиле масивне протеинске фракције која по молекулској маси одговарају тешким и лаким ланцима IgG (52 kDa и 25 kDa). Количина тешких ланаца који су изоловани на протеину А, тј. који потичу од IgG2, је била већа код болесне телади у свим узорцима осим у узорцима добијеним јоноизмењивачком хроматографијом. Удео тешких ланаца пореклом од IgG2 је био нижи у СИС него у пуним серумима што говори да IgG2 телади старе три месеца или немају висок капацитет за формирање имунокомплекса или имунокомплекси које они формирају остају на месту инфламације. Без имунохистохемијске анализе ткива плућа болесне телади не можемо да знамо која је од ове две претпоставке тачна. Без обзира на смањен удео IgG2 у СИС, код болесне телади је садржај овог изотипа је био повишен. Повећан удео тешких ланаца пореклом од IgG2 је детектован и у нефракционисаним серумима и у риванол-солубилним протеинима серума. У изолатима IgG добијеним јоноизмењивачком хроматографијом, количина ланаца пореклом од IgG2 код болесне телади је била мања него код здраве телади.

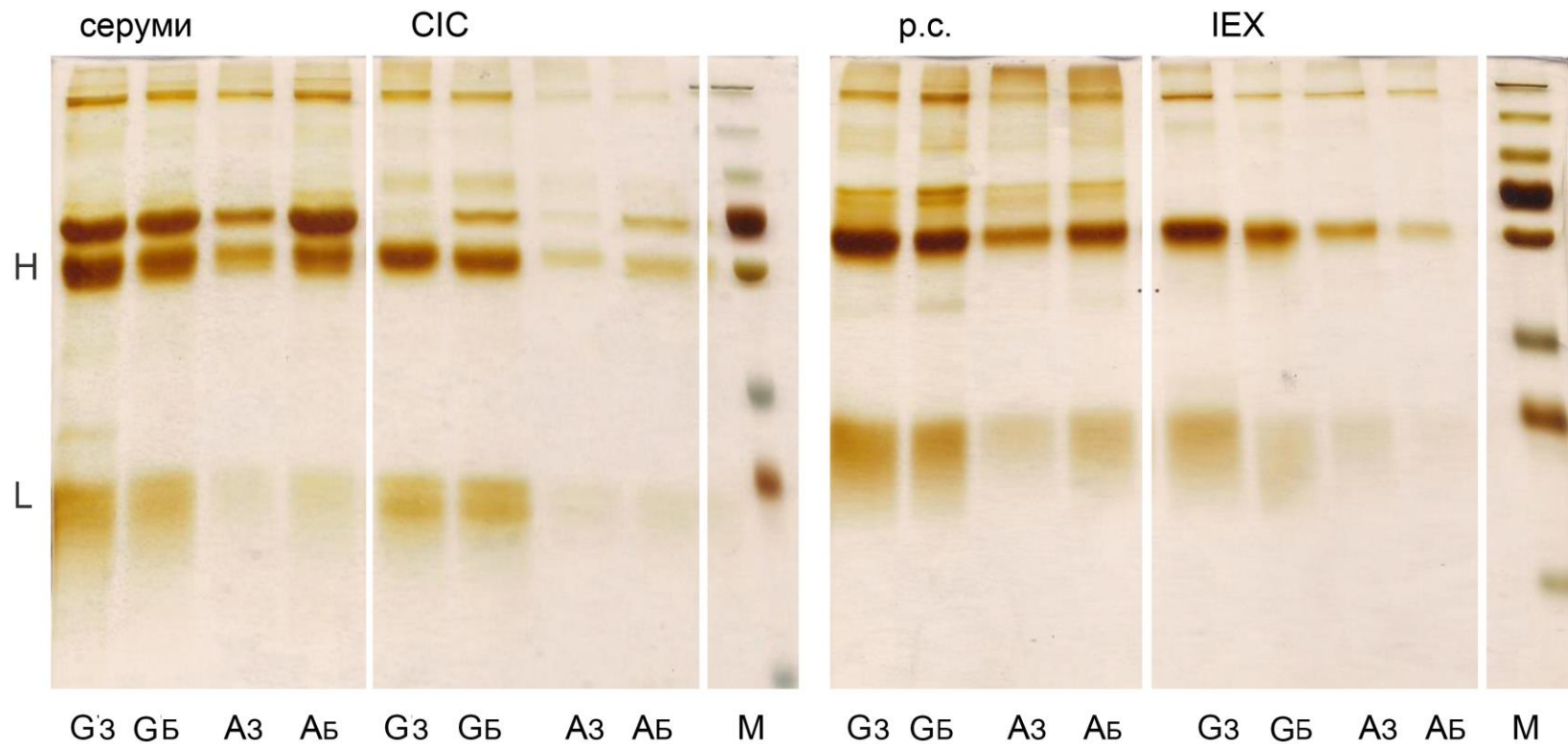
Количина лаких ланаца IgG изолованих на протеину А и протеину G приближно одговара садржају тешких ланаца IgG у свим изолатима осим у изолатима СИС на протеину А код којих је повећање фракције која одговара лаким ланцима био мањи, у односу на повећање фракције која по молекулској маси одговара тешким ланцима. С обзиром да тешки ланци у редукујућој електрофорези прате „понашање“ интактних IgG2 које је регистровано у нередукујућој електрофорези, разлике у садржају тешких и лаких ланаца могу да нам указују да се у фракцији лаких ланаца налазе и неки други протеини (као нпр. даљи деградациони производи тешких ланаца IgG).

Осим тешких и лаких ланаца у изолатима серума и СИС на протеину G и протеину А постојала је интензивна фракција од 65 kDa. Највећи пораст ове фракције код болесне телади (4,3 пута) је регистрован у изолатима СИС на протеину А. У изолатима риванол-солубилних протеина детектоване су фракције од 65 kDa и 71 kDa и њихов садржај је био повећан код болесне телади. Овако интензивна фракција од 65 kDa није нађена у СИС телади са тежом клиничком формом болести [13]. Протеин од 65 kDa по молекулској маси одговара говеђем албумину. У серуму здравих људи албумин и IgG формирају комплексе, који чине 12-16% протеина серума здравих особа [160]. Овакви имунокомплекси су

детектовани и у серуму болесника са хепатитисом [161, 162], дијабетесом [163] и мултиплим мијеломом [164]. Код здравих људи, албумин-IgG комплекси *in vitro* скоро у потпуности инхибирају адхезију тромбоцита за стакло, док смеша албумина и IgG који нису у форми имунокомплекса не утичу на адхезивност тромбоцита [160]. Каква је улога албумина које смо ми детектовали у изолатима IgG код телади није познато. Њихово присуство би могло да буде последица везивања за албумин везујуће место на протеину G или чак последица неспецифичних интеракција са компонентама матрикса.

Специфична за СИС је била фракција од 80 kDa која по молекулској маси одговара μ тешким ланцима. Ова фракција је копреципитирала са IgG из СИС и код телади тежом клиничком формом болести [13]. Код људи са пнеумонијом изазваном *Mycoplasma pneumoniae* појава анти IgG-IgM имунокомплекса типа реуматоидног фактора (RF) се повезује са опоравком, или има улогу у опоравку од болести, док је пад у њиховој концентрацији, коју прати поваћање нивоа активних IgG имунокомплекса, карактеристичан за екзарцербацију болести [85]. Да ли се овакви протективни IgG-IgM имунокомплекса формирају и код телади говеда није познато.

Протеине молекулске масе 28 и 92 kDa који су копреципитирали са IgG СИС телади са тежом формом болести нисмо детектовали у овој студији.



Слика 3.16. SDS-PAGE у редукујућим условима: IgG афинитетно изоловани на протеин G и протеин A Dynabeads матриксу из збирних узорака серума, CIC, риванол-солубилних протеина серума (p.c.) и протеина серума изолованих анјонском измењивачком хроматографијом (IEX) здраве телади (З) и телади са бронхопнеумонијом (Б). количина узорка 30 μ L; 12% гел за раздвајање; бојење сребром. М: протеински маркери молекулских маса 250, 130, 82, 64, 49, 37, 26 и 19 kDa.

Табела 3.12. Молекулска маса протеинских фракција изолата на протеин G и протеин A Dynabeads афинитетном матриксу збирних узорака серума, CIC, риванол-солубилних протеина серума и протеина серума изолованих анјонском измењивачком хроматографијом здраве телади и телади са бронхопнеумонијом: SDS-PAGE у редукујућим условима.

молекулска тежина (x1000)															
Серум				CIC				p.c.				IEX			
З	Б	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б	З	Б
G	G	A	A	G	G	A	A	G	G	A	A	G	G	A	A
250	250	250	250	250	250			250	250	250	250	250	250	250	250
									230						
160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160
121	121	121	121	121	121										
101	101	101	101					101	101	101	101	101	101		
								87	87	87	87				
				80	80	80	80								
71	71		71					71	71	71	71				
65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65				
52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52
41								41	41		41				
33															
25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
22	22			22	22	22									

H_γ

L

З – здрава телади; Б – телади са бронхопнеумонијом; G – изолати на протеин G афинитетном матриксу; A – изолати на протеин A афинитетном матриксу; p.c. – риванол-солубилни протеини серума; IEX - протеини серума изоловани јоноизмењивачком хроматографијом.

Табела 3.13. Промена садржаја интактних IgG, и слободних тешких и лаквих ланаца изолованих на протеин G и протеин A Duplebeads матриксу из збирних узорака серума, CIC, риванол-солубилних протеина серума (p.c.) и протеина серума изолованих ањонском измењивачком хроматографијом (IEX) здраве телади и телади са бронхопнеумонијом: SDS-PAGE у редукујућим условима.

	160 kDa			65 kDa			H γ			L		
	количина		↑/↓	количина		↑/↓	количина		↑/↓	количина		↑/↓
	З	Б		З	Б		З	Б		З	Б	
серум G	182	103	0.6	511	485	1.0	593	463	0.8	527	389	0.7
A	73	156	2.1	271	547	2.0	316	457	1.4	131	177	1.4
CIC G	93	91	1.0	39	171	4.3	533	500	0.9	445	468	1.1
A	27	29	1.1	31	157	4.3	115	193	1.7	115	103	0.9
p.c. G	145	174	1.2	326	240	0.7	1042	627	0.6	1150	771	0.7
A	128	181	1.4	169	194	1.1	506	611	1.2	354	599	1.7
IEX G	174.4	92.2	0.5	/	/		822	552	0.7	780	356	0.5
A	27.2	16.3	0.6	/	/		287	116	0.4	198	61	0.3
G/A												
	З	Б	↑/↓ [◊]	З	Б	↑/↓ [◊]	З	Б	↑/↓ [◊]	З	Б	↑/↓ [◊]
Серум	2.5	0.7	3.8	1.9	0.9	2.1	1.9	1.0	1.9	4.0	2.2	1.8
CIC	0.8	1.7	0.5	1.3	1.3	1.0	4.6	2.6	1.8	3.9	4.5	0.9
p.c.	3.4	3.1	1.1	1.9	1.2	1.6	2.1	1.0	2.0	3.3	1.3	2.5
IEX	0.2	0.2	1.1	/	/		2.9	4.8	0.6	3.9	5.8	0.7

Количина IgG, тешких ланаца (H γ) и лаквих ланаца (L) је одређен дензитометријски и представља површину пика одговарајуће фракције. Вредност изражена као број пиксела/1000. ↑/↓: промена у садржају код болесне телади. Вредност представља количник површина пика IgG или H γ болесне и здраве телади.

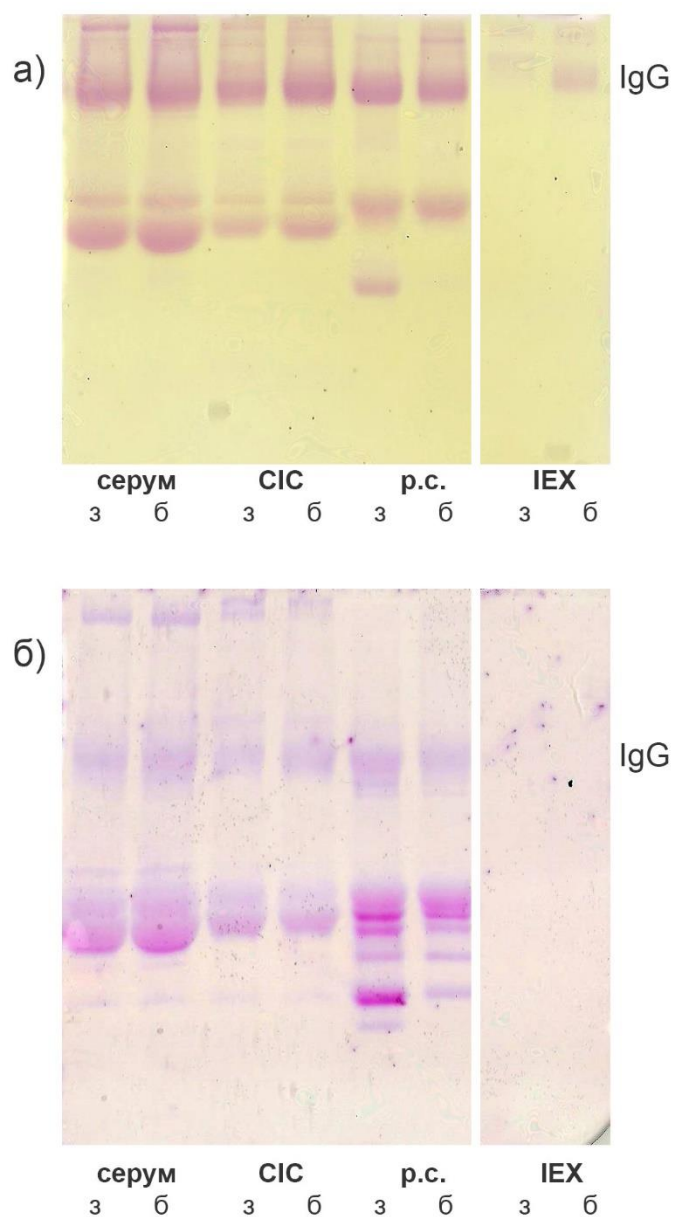
G/A: релативни удео IgG2 у IgG изолованих на протеину G и протеину A. ↑/↓[◊]: промена у садржају протеин A везујућих IgG и H γ болесне телади. Исказана је као реципрочна вредност G/A односа болесне и здраве телади.

3.1.4.3.4 Гликани IgG серума и СИС

У нашој ранијој студији рађеној на телади са тежом клиничком формом бронхопнеумоније, на основу реактивности са биљним лектинама специфичним за терминалне шећере IgG гликана, показали смо да се у СИС болесне телади налазе IgG са измењеном експресијом гликана [13]. Код болесне телади детектовали смо галактозу на лаким ланцима IgG и 2,5 пута и 14 пута повећану реактивност тешких и лаким ланаца IgG са SNA лектином из *Sambucus nigra*, који је специфичан за сијалинску киселину.

У овој студији гликозилацију IgG серума и серумских фракција и IgG СИС анализирали смо бојењем гликопротеина у гелу *Shiff* -им реагенсом и *Stain all* реагенсом (слика 3.17, табела 3.14). Ни једним од ова два бојења нисмо детектовали значајну промену гликозилације на укупним IgG серума, риванол-солубилним IgG и IgG СИС. Незнатна промена у гликозилацији укупних протеина СИС и изолованим IgG СИС је била у корелацији са само незнатно повећаним (на граници значајности; $p=0,049$) зета потенцијалом СИС болесне телади. Међутим експресија гликана на фракцији IgG серума која се изолује јоноизмењивачком хроматографијом детектовано је значајно повећање експресије гликана, и то повећање је било карактеристично за IgG ниже молекулске масе.

Гликозилација тешких и лаким ланаца афинитетно изолованих IgG серума, СИС и риванол-солубилних протеина серума телади анализирана је бојењем *Stain all* реагенсом (слика 3.18). Након бојења у свим изолатима били су присутни гликопротеини који по молекулској маси одговарају тешким и лаким ланцима IgG. Интензитет реактивности са *Stain all* реагенсом је корелирао са интензитетом добијеним бојењем сребром. Гликопротеин молекулске масе 65 kDa је био присутан у изолатима серума и СИС. У оба изолата серумских IgG и изолатима IgG СИС на протеину G реактивност добијена *Stain all* бојењем је одговарала интензитету добијеном бојењем сребром. Међутим, у изолату IgG СИС на протеину A реактивност ове фракције добијена *Stain all* бојењем, је била виша у односу на реактивност добијену бојењем сребром. Ово је показало да је у СИС болесне телади ова протеинска фракција била интензивније гликозилована. Гликопротеин молекулске масе 70 kDa налазио се у свим изолатима, али је његова експресија била снажна само у изолату риванол-солубилних IgG на протеину G.

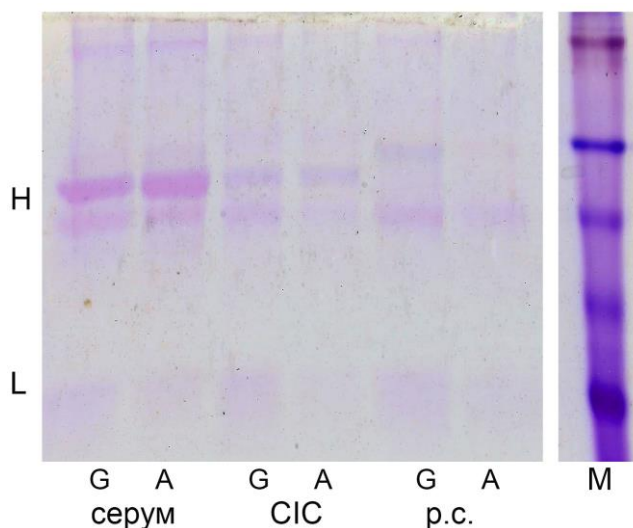


Слика 3.17. Гликопротеини збирних узорака серума, CIC, риванол-солубилних (р.с) протеина серума и протеина серума изолованих јоноизмењивачком хроматографијом (IEX) здраве телади (з) и телади са бронхопнеумонијом (б). Бојење (а) *Stain all* и (б) *Shiff*-овим реагенсом након SDS-PAGE у нередукујућим условима; 8% гел за раздвајање; количина протеина 15 μg .

Табела 3.14. Промена нивоа гликозилације IgG код телади са бронхопнеумонијом у односу на здраву телад.

Промена експресије IgG гликана				
	Серум	CIC	р.с.	IEX
<i>Stain All</i> реагенс	1,1	1,0	1,1	4,4
<i>Shiff</i> -ов реагенс	1,2	0,9	1,1	/

Гликозилација IgG збирних узорака серума, CIC, риванол-солубилних (р.с) протеина серума и протеина серума изолованих јоноизмењивачком хроматографијом (IEX) телади са бронхопнеумонијом и здраве телади су анализирани бојењем у гелу *Stain all* и *Shiff*-овим реагенсом (слика 3.15). Ниво гликозилације је израчунат као количник површине пика IgG након бојења за гликопротеине са површином пика IgG добијеног након бојења гела СВВ (слике 3.7, 3.12 и 3.13). Релативна промена гликозилације IgG код болесне телади је израчуната као количник нивоа гликозилације IgG болесне и здраве телади.



Слика 3.18. Гликозилација IgG узорака серума, CIC, и риванол-солубилних (р.с) протеина серума телади са бронхопнеумонијом. IgG афинитетно изоловани на протеину G и протеину A. Бојење *Stain all* реагенсом након SDS-PAGE у редукујућим условима; 12% гел за раздвајање; запремина изолата 30 μ l. M – протеински маркери молекулских маса 100 kDa, 75 kDa, 55 kDa, 35 kDa и 25 kDa.

3.1.5 Липопротеини и липиди серума и СИС телади са бронхопнеумонијом

Познато је да имуноглобулини формирају комплексе са липидима и липопротеинима током имунизације [104] и да липопротеини и липиди у саставу имунокомплекса делују као имуномодулатори [121, 122, 124]. Студије у којима су испитиване промене концентрације липида у респираторним болестима плућа су малобројне [15, 111, 112], а липидне компоненте у саставу имунокомплекса код телади нису до сада изучаване.

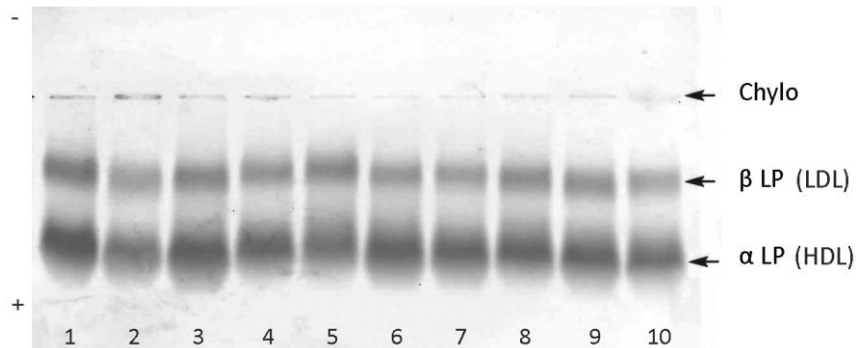
3.1.5.1 Липопротени крвног серума и СИС телади са бронхопнеумонијом

Код људи [103, 107], појава инфламаторних и инфективних болести по себи, као и тежина клиничке слике болести, утичу на садржај липида и липопротеина. Утицај тежине болести на садржај липида у бронхопнеумонији телади није до сада испитиван. По нашим сазнањима ово је прва студија у којој су анализирани липиди код телади са благом клиничком формом бронхопнеумоније.

Липопротеини крвног серума и СИС су анализирани електрофорезом у гелу агарозе и нативној PAGE. У гелу агарозе, након бојења *Fat Red* (боји неутралне липиде, триглицериде и холестерол) липопротеини серума здраве и болесне телади раздвајају се у три фракције: α и β липопротеине и хиломикроне који остају на месту постављања (слика 3.19). Фракције липопротеина серума говеда са електрофоретском покретљивости у α и β зони одговарају HDL и LDL липопротеинима [104]. Хиломикрони, због своје велике масе су непокретни и остају у гелу на месту постављања.

Релативне концентрације (%) α и β липопротеина болесне телади и здраве телади биле се једнаке. Међутим, апсолутна концентрација α липопротеина (процена дензитометријом на основу интезитета) је код болесне телади била већа за 23% (табела 3.15). Липопротеини СИС су се у гелу агарозе након бојења *Fat Red* раздвајали на фракцију хиломикрона и фракцију која је имала широку

електрофоретску покретљивост у пре- β - β -пост- β зони (слика 3.20). И код здраве и болесне телади у овој фракцији налазило се 90% липопротеина С1С.



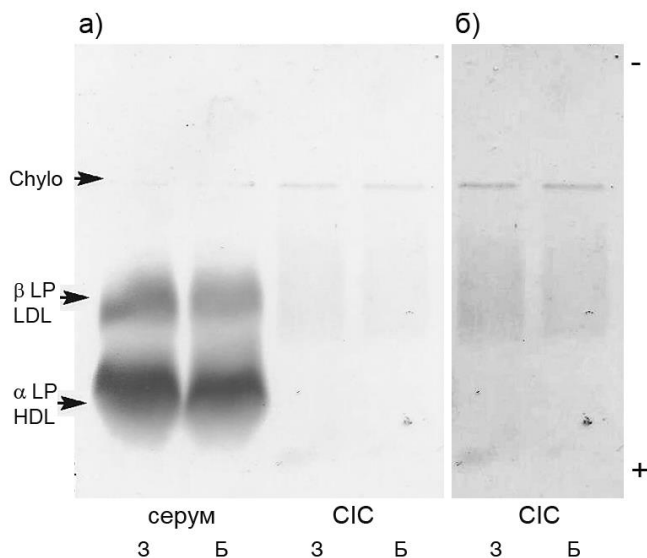
Слика 3.19. Електрофореза у гелу агарозе липопротеина телади, бојење *Fat red*. Линије 1-5 – појединачни узорци серума здраве телади; линије 6-10 - појединачни узорци серума телади са бронхопнеумонијом; Chylo – хиломикрони; LP – липопротеини; HDL – липопротеини велике густине; LDL – липопротеини мале густине. Запремина узорка: 5 μ l.

Табела 3.15. Липопротеини у серумима телади са бронхопнеумонијом: електрофореза у гелу агарозе, бојење *Fat Red*.

		Здрави	Болесни	$\uparrow\downarrow$
Хиломикрони	%	2 ± 2 1 (0-7)	1 ± 1 1 (0-2)	
	количина	15 ± 12 13 (1-38)	12 ± 10 12 (0-36)	
	%	27 ± 5 26 (19-34)	26 ± 4 25 (20-32)	
β липопротеини	количина	311 ± 145 266 94 ± 623	336 ± 84 334 180 ± 497	
	%	74 ± 3 74 (70-77)	74 ± 4 74 (66-82)	
	количина	783 ± 248 801 (329-1267)	962 ± 152 962 (688-1226)	* 23% \uparrow

%; релативна заступљеност фракције у укупним протеинима; Количина липопротеина је одређена дензитометријски и представља површину пика одговарајуће фракције. Вредност изражена као број пиксела/1000. Приказани су

средња вредност \pm стандардна девијација, медијана (коса слова) и опсег од најмање до највеће вредности (у загради). (*) статистички значајна разлика између здраве и болесне телади; \uparrow проценат пораста код болесне телади.

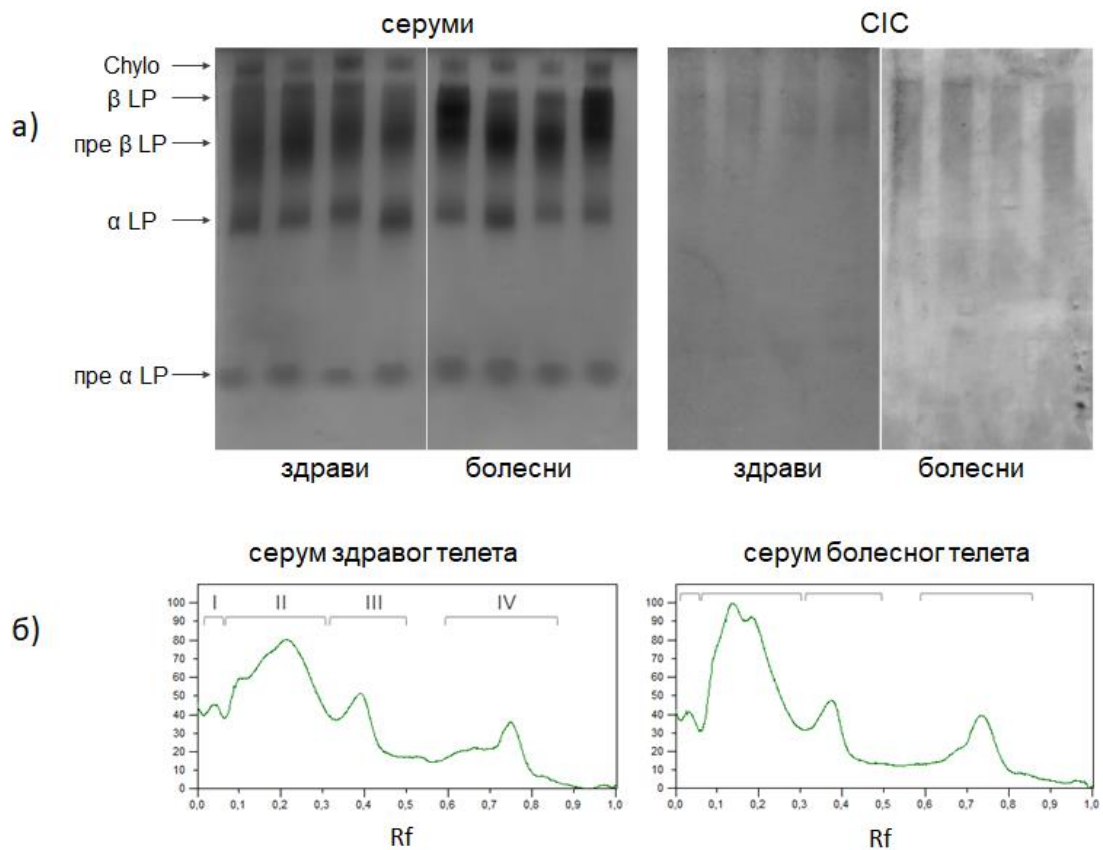


Слика 3.20. Електрофореза у гелу агарозе липопротеина збирних узорака серума и CIC здраве телади (З) и телади са бронхопнеумонијом (Б); бојење *Fat red*. а) реалан интензитет боје; б) софтверски појачана боја липопротеина CIC. Chylo – хиломикрони; LP – липопротеини; HDL – липопротеини велике густине; LDL – липопротеини мале густине. Запремина узорка: 5 μ l.

У следећим експериментима липопротеинске фракције раздвајали смо нативном PAGE и визуелизовали судан црним, бојом која боји све класе липида (слика 3.21, табела 3.16). За ову електрофорезу смо се одлучили јер је познато да се у агарозним геловима судан црним боје само α и пре α липопротеини говеда ([104]; наши непубликовани резултати). Липопротеини серума здраве и болесне телади се нативном PAGE раздвајају на четири фракције: $\alpha 1$ и $\alpha 2$ липопротеине, суперпониране пре β - и β - липопротеине и хиломикроне. Релативна концентрација (%) и садржај липида у ове четири фракције није била промењена код болесне телади. У фракцији пре β - и β - липопротеина, денситометријском анализом се уочавају три субфракције. Код неке болесне телади, детектован је повећан садржај две спорије (катодне) субфракције. Прецизна квантификација ових фракција, због њиховог преклапања, није била могућа.

Липопротеини CIC и здраве и болесне телади су и након раздвајања у нативној PAGE формирали једну фракцију широке електрофоретске

покретљивости у пре- β - β -пост- β зони. Ретки подаци о електрофортским карактеристикама липопroteина PEG преципитабилних CIC животиња показују да се у њима код неимунизованих кунића налазе само β липопroteини [165].



Слика 3.21. Нативна PAGE липопroteина здраве теледи и теледи са бронхопнеумонијом. а) електрофореграми појединачних узорака серума и CIC LP – липопroteини; Chylo– хиломикрони. б) Дензитометријски запис електрофореграма серума здравог и болесног телета. I – хиломикрони; II – суперпониране фракције β - и пре β липопroteина; III – α липопroteини; IV – пре α липопroteини. Бојење судан црним. Запремина узорка: 30 μ l.

Табела 3.16. Липопротеини у серумима телади са бронхопнеумонијом: нативна PAGE, бојење судан црним.

		здрави	болесни
Хиломикрони	%	9 ± 4 9 (5-15)	10 ± 3 9 (6-17)
	количина	82 ± 21 71 (59-112)	75 ± 19 72 (48-112)
	β + пре β липопротеини	51 ± 12 52 (24-64)	52 ± 5 53 (43-62)
	количина	461 ± 113 491 269 ± 578	412 ± 108 427 230 ± 543
α1 липопротеини	%	22 ± 4 22 (16-29)	25 ± 4 25 (19-29)
	количина	202 ± 55 189 115 ± 282	198 ± 57 197 120 ± 269
	α2 липопротеини	14 ± 6 14 (6-23)	13 ± 3 13 (8-18)
количина	143 ± 88 127 (44-271)	109 ± 54 102 (52-187)	

‰: релативна заступљеност фракције у укупним протеинима; Количина липопротеина је одређена дензитометријски и представља површину пика одговарајуће фракције. Вредност је изражена као број пиксела/10000. Приказани су средња вредност ± стандардна девијација, медијана (коса слова) и опсег од најмање до највеће вредности (у загради).

3.1.5.2 Концентрације неутралних липида крвног серума и С1С

Концентрације триглицерида, укупног холестерола, холестерола у саставу HDL (HDL-холестерол) и холестерола у саставу LDL (LDL-холестерол) приказане су у табели 3.17. У серуму болесне телади није примећена значајна

промена у концентрацији укупног холестерола, али је концентрација HDL-холестерола повећана за 23%, а LDL-холестерола смањена за 41%. Концентрација триглицерида је била повећана у серуму болесне телади. У СИС, неутрални липиди су се налазили у траговима, у концентрацији недовољној за детекцију примењеном методом.

Табела 3.17. Концентрација неутралних липида у серуму телади са бронхопнеумонијом.

mmol/L	Здрави	болесни	
Укупни	2,43 ± 0,06	2,66 ± 0,44	
Холестерол	2,37 (1,22 - 3,35)	2,71 (1,85- 3,43)	
HDL	1,77± 0,57	2,18 ± 0,36	* 23% ↑
Холестерол	1,7 (0,63 - 2,67)	2,26 (1,51- 2,77)	
LDL	0,53± 0,42	0,31 ± 0,11	# 41% ↓
Холестерол	0,4 (0,10 - 1,59)	0,33 (0,11- 0,52)	
Триглицериди	0,29± 0,06	0,36 ± 0,09	* 26% ↑
	0,28 (0,21 - 0,39)	0,32 (0,19- 0,55)	

Приказани су средња вредност ± стандардна девијација, медијана (коса слова) и опсег од најмање до највеће вредности (у загради). (*) статистички значајна разлика између здраве и болесне телади ($p < 0.05$); (#): разлика близу статистички значајне ($p = 0.05$); проценат ↑ пораста или ↓ смањена концентрације код болесне телади.

У нашој студији, у складу са резултатима других студија у којима је анализирана концентрација липида и липопротеина у серумима телади са инфективним болестима плућа [15, 111, 112], детектована је повећана концентрација триглицерида код болесне телади. За разлику од других аутора ми нисмо детектовали промену концентрације укупног холестерола, а концентрација HDL липопротеина (*Fat red* бојење) и концентрација холестерола у HDL липопротеинима је била повишена. HDL везује и неутралише бактеријске липополисахариде и снижава инфламаторни одговор [105, 106]. Наша претпоставка је, да је пораст концентрације HDL, заправо један од адаптивних

механизама који се јавља у одговору на бактеријску инфекцију и доводи до смањења инфламације, тј. до благе клиничке слике.

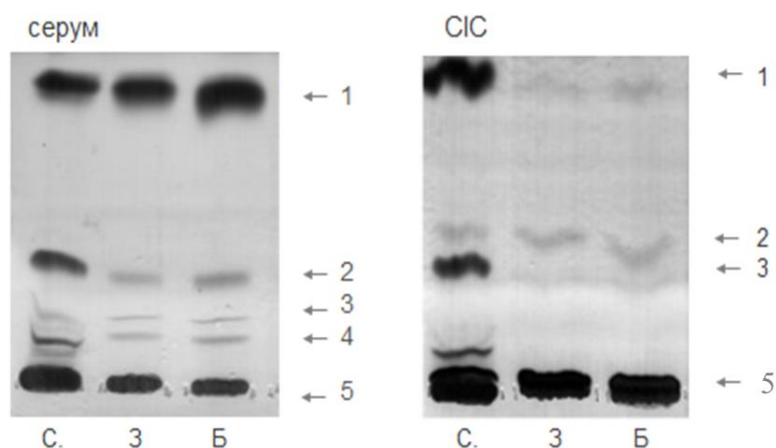
LDL (β) липопротеини и оксидовани липиди (масне киселине) у њиховом саставу су, по правилу, повишени у инфламаторним/инфективним болестима људи [120]. Такође, повећан садржај β липопротеина и холестерола детектован је након природне или вештачке имунизације неких врста код неких експерименталних животиња (кунић имунизован колостралним серумом говеда, концентровано људском пљувачком или урином) [104]. Оксидовани (β) липопротеини улазе у састав СИС у неким инфламаторним болестима људи [121]. Само код неке телади са бронхопнеумонијом смо нативном PAGE детектовали повећање садржаја катјонских субфракција β липопротеина, али је концентрација холестерола у LDL липопротеинима била смањена. Фосфолипидемија и хипохолестеролемија у серуму и смањење концентрације фосфолипида и холестерола у β липопротеинима детектоване су код коња имунизованих токсидом тетануса, и код оваца имунизованих ксеногеним имуноглобулинима. Сматра се да су ове липидемије последица стварања комплекса са IgG [104]. Велика хипо-LDL холестеролемија (41%) детектована у нашем раду вероватно није у целини последица формирања комплекса са IgG. Међутим, појава липопротеина СИС у зони пост- β електрофоретске покретљивости, јесте резултат формирања комплекса липида и IgG [104]. У нашем раду нисмо детектовали промену у електрофоретској покретљивости или у интензитету бојене реакције у липопротеинима СИС здраве и болесне телади, стога можемо да сматрамо да је формирање комплекса липида и IgG код телета део физиолошког имунског одговора.

3.1.5.3 Анализа састава липида крвног серума и СИС хроматографијом на танком слоју силика гела

Хроматографијом липида на танком слоју силика гела у серуму здраве телади и телади са бронхопнеумонијом, детектовани су фосфолипиди и

неутрални липиди: холестерил-естри, триглицериди, слободне масне киселине и холестерол (слика 3.22, табела 3.18). Од неутралних липида, у највећем проценту били су присутни холестерил-естри. Дензитометријска анализа липидног хроматограма показала је да серум болесне телади садржи мањи проценат фосфолипида и већи проценат неутралних липида (холестерил-естри, триглицериди, слободне масне киселине и холестерол), него серум здраве телади. Промена релативног садржаја липидних фракција је у складу са резултатима бројних истраживања која су показала да инфекција/инфламација као и експериментална имунизација, доводи до промена садржаја липидних фракција.

Липиди у саставу СИС домаћих и експерименталних животиња су ретко анализирани. На кунџима је показано да се у PEG талозима као доминантни налазе фосфолипиди и естри холестерола, и да је у малој концентрацији био присутан и слободан холестерол [165]. Липиди изоловани из СИС телади су садржали нешто мање од 20% неутралних липида, док су фосфолипиди чинили више од 80% липида раздвојених танкослојном хроматографијом.



Слика 3.22. Хроматографија на танком слоју силика гела неутралних липида екстрахованих из збирних узорка серума и СИС здраве телади (З) и телади са бронхопнеумонијом (Б). С. – стандард неутралних липида, 1- холестерил-естри, 2- триглицериди, 3- слободне масне киселине, 4- холестерол, 5- фосфолипиди.

Од неутралних липида из СИС су изоловани холестерил-естри, триглицериди и слободне масне киселине, док холестерол није детектован. Vitić [104] је показала да се у липидима везаним за IgG серума замораца и оваца

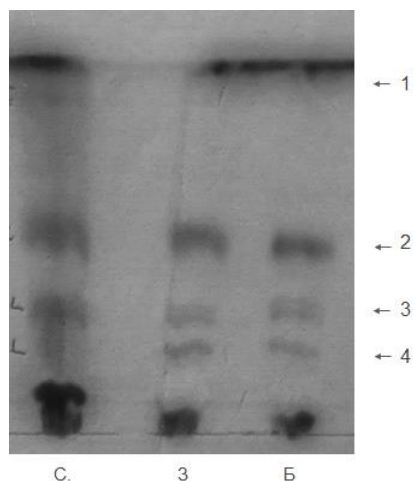
(фракција риванол-солубилних IgG додатно пречишћених амонијум сулфатом) налазио низак проценат неутралних липида, и то скоро искључиво холестерил-естри. Код одраслих говеда, кунића и коња за ову класу серумских IgG су били везани сви неутрални липиди који су били присутни у серуму.

Табела 3.18. Процент фракција липида збирних узорака серума и СИС здраве телади и телади са бронхопнеумонијом раздвојених хроматографијом на танком слоју силика гела. Дензитометријска анализа хроматограма са слике 3.22.

%	збирни серум	
	Здрави	болесни
Неутрални липиди	69	77
Холестерил-естри	59	62
Триглицериди	6	10
Слободне масне киселине	1	2
Холестерол	3	4
Фосфолипиди	31	23
%	збирни СИС	
	Здрави	болесни
Неутрални липиди	17	11
Холестерил-естри	4	6
Триглицериди	8	3
Слободне масне киселине	5	2
Холестерол	/	/
Фосфолипиди	83	89

Као и у серумима одраслих говеда [104], у серуму обе групе телади танкослојном хроматографијом су идентификовани фосфатидилхолин, сфингофосфолипиди и лизофосфатидилхолин (слика 3.23, табела 3.19). Код болесне телади проценат удела лизофосфатидилхолина је био мањи, а сфинголипида већи.

На танком слоју силика гела 60 GF 254 није било могуће раздвојити фосфолипиде СИС. Фосфолипиди СИС су били у комплексу са протеинима, а ови комплекси су током раздвајања формирали један „фронт“ недалеко од места постављања (резултати нису приказани).



Слика 3.23. Хроматографија на танком слоју силика гела фосфолипида екстрахованих из збирних узорака серума здраве телади (З) и телади са бронхопнеумонијом (Б). С.–стандард фосфолипида, 1– фосфатидилетаноламин, 2 – фосфатидилхолин, 3 – сфингофосфолипиди, 4 – лизофосфатидил холин.

Табела 3.19. Процент фракција фосфолипида збирних узорака серума здраве телади и телади са бронхопнеумонијом раздвојених хроматографијом на танком слоју силика гела. Дензитометријска анализа хроматограма са слике 3.23.

%	збирни серум	
	Здрави	болесни
Фосфатидилхолин	64	67
Сфингофосфолипиди	15	20
Лизофосфатидилхолин	21	13

3.1.5.4 Маснокиселински профил фосфолипида серума и СИС

Процент масних киселина у фосфолипидима серума и СИС здраве телади и телади са бронхопнеумонијом, прво је анализиран у мањем броју насумично изабраних узорака (табела 3.20). Због великих индивидуалних варијација одлучили смо да анализу наставимо на збирним узорцима, који много реалније осликавају стање анализираних група телади.

Одређивањем маснокиселинског профила у фосфолипидима збирних узорака серума и здраве и болесне телади детектовано је 13 масних киселина, а у

СИС 9 масних киселина (табеле 3.20 и 3.21; слике 3.24 и 3.25). И у серуму и у СИС су биле присутне засићене, мононезасићене и полинезасићене масне киселине. Ни код здраве ни код болесне телади садржај масних киселина у фосфолипидима серума и СИС није био једнак. У фосфолипидима серума, у највећем проценту (10-40%) налазиле су се олеинска, стеаринска, линолна и палмитинска киселина, а у фосфолипидима СИС доминирала је олеинска киселина (>60%), а још само палмитинска киселина је била у количини већој од 10%.

Од засићених масних киселина у серуму телади, биле су присутне миристинска, палмитинска и стеаринска киселина. У фосфолипидима серума болесне телади проценти палмитинске и стеаринске киселине су били повећани за 30 и 100 %, респективно, а миристинске смањени за 80%. Процент мононезасићених масних киселина (палмитолеинска, олеинска и вакценска киселина) био је нижи у серумима болесне телади у односу на здраве контроле. У серумима и здраве и болесне телади детектовано је присуство полинезасићених масних киселина (линолна, дихомо- γ - линоленска, арахидонска, еикозапентаенска, докозатетраенска, докозапентаенска и докозахексаенска) које су све, осим докозатетраенске, у повећаном проценту налазиле код болесне телади.

Гасном хроматографијом је показано да се и у фосфолипидима СИС налазе засићене (миристинска, палмитинска и стеаринска), мононезасићене (палмитолеинска, олеинска и вакценска) и полинезасићене масне киселине (линолна, дихомо-гама линолеинска и арахидонска). У фосфолипидима СИС болесне телади проценат свих засићених масних киселина је био благо снижен. Садржај мононезасићених масних киселина је био, или благо повишен (за 10% олеинска и вакценска киселина), или није био промењен (палмитолеинска киселина). Од полинезасићених масних киселина, проценат линолне и арахидонске је био смањен код болесне телади, док је проценат дихомо-гама линолеинске киселине остао непромењен.

Описан је значај промене садржаја масних киселина и њихово порекло као липидних конституенти *P. multocida* [166], или ендогених липида телади [167]. Свакако интересантан податак представља чињеница да је ниво арахидонске киселине, прекурсора бројних липидних медијатора и имунорегулатора (простагландини, леукотријени, тромбокساني...) био већи у серумима болесних

животиња. Повећан ниво арахидонске киселине је детектован у плазми телади којима је пнеумонија изазвана експериментално коинфекцијом говеђим херпес вирусом тип I и бактеријом *M. haemolytica* [168]. Код ове телади детектоване су и повишене концентрације олеинске и палмитинске киселине и стеаринске. Код телади којима је интравенски даван LPS *M. haemolytica*, детектован је дуготрајан пораст олеинске и палмитинске киселине, док је пораст стеаринске киселине био само пролазан [169].

Табела 3.20. Процент масних киселина у фосфолипидима серума и СИС здраве телади и телади са бронхопнеумонијом: Гасно-течна хроматографија.

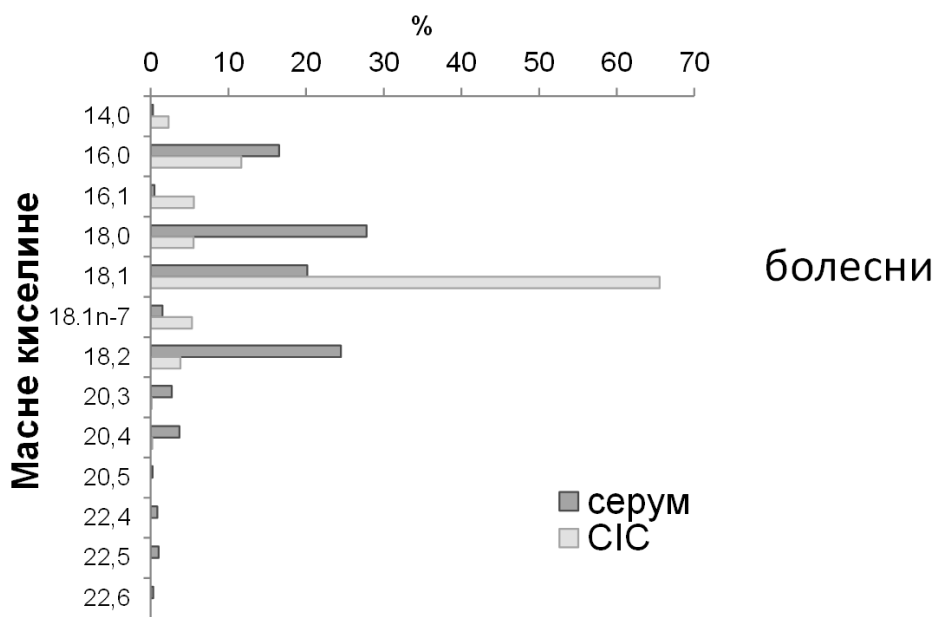
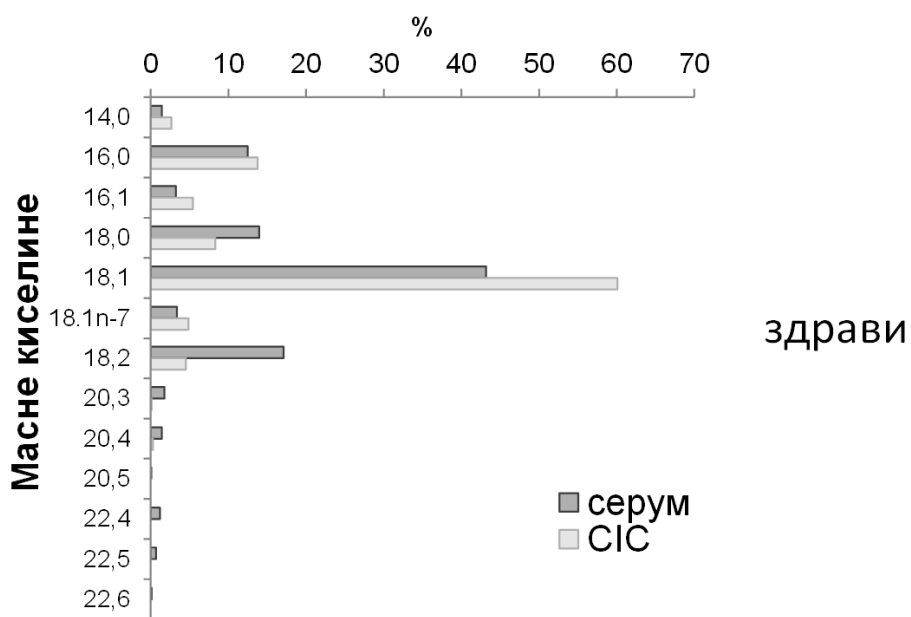
		% масних киселина у фосфолипидима							
масне киселине	број С атома	серум здрави		серум болесни		СИС здрави		СИС болесни	
		појединачни	збирни	појединачни	збирни	појединачни	збирни	појединачни	збирни
		n=1	n=15	n=3	n=23	n=4	n=15	n=3	n=23
Миристинска	14,0	1,3	1,4	1,1 ± 0,2 <i>1,1</i> 21%	0,3	2,7 ± 1,0 <i>3,0</i> 65%	2,6	0,4 ± 0,4 <i>0,6</i> 86%	2,3
Палмитинска	16,0	45,6	12,5	29,9 ± 7,5 <i>29,9</i> 25%	16,5	24,2 ± 5,0 <i>23,7</i> 21%	13,8	25,6 ± 8,4 <i>27,9</i> 33%	11,7
Палмитолеинска	16,1	/	3,3	0,5 ± 0,6 <i>0,5</i> 124%	0,5	0,8 ± 1,2 <i>0,2</i> 148%	5,4	0,0 ± 0,1 <i>0,0</i> 173%	5,6
Стеаринска	18,0	50,2	14,0	51,6 ± 15,6 <i>51,6</i> 30%	27,8	30,1 ± 5,2 <i>32,4</i> 17%	8,3	20,1 ± 8,7 <i>17,9</i> 42%	5,5
Олеинска	18,1	0,7	43,2	/	20,1	0,7 ± 0,8 <i>0,3</i> 123%	60,1	0,2 ± 0,2 <i>0,2</i> 107%	65,5
Вакценска	18,1n-7	/	3,4	/	1,5	0,6 ± 0,5 <i>0,3</i> 84%	4,9	0,3 ± 0,2 <i>0,3</i> 64%	5,3

Приказани су средња вредност ± стандардна девијација и медијана (коса слова). Сива слова: коефицијент варијације

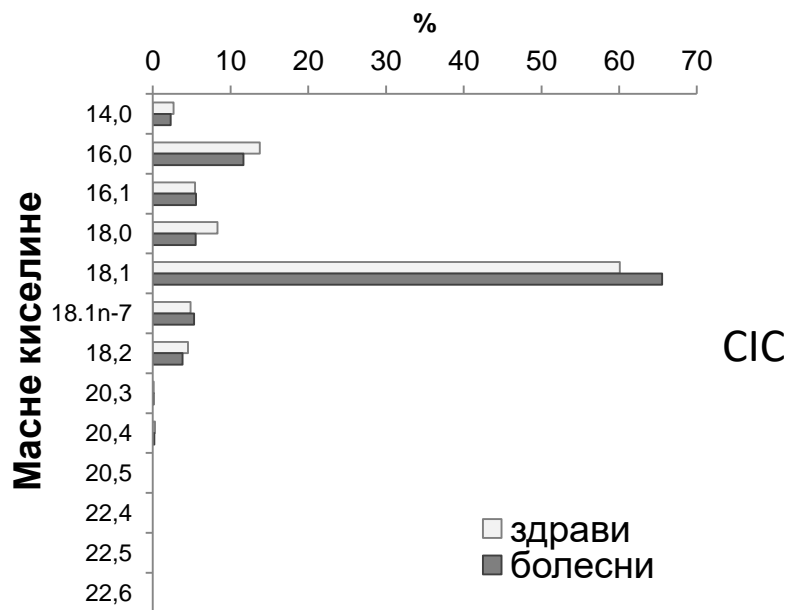
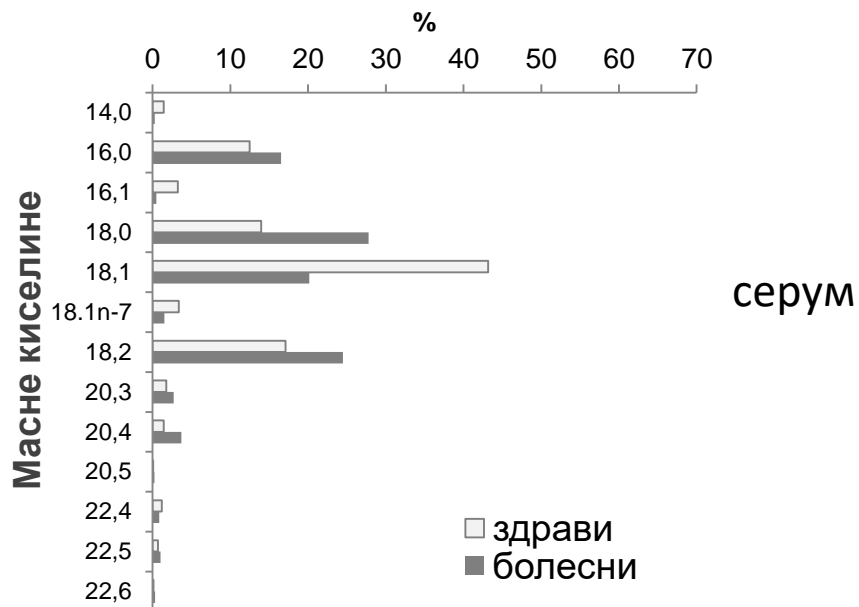
Табела 3.20. Наставак

масне киселине	број С атома	% масних киселина у фосфолипидима							
		серум здрави		серум болесни		СИС здрави		СИС болесни	
		појединачни n=1	збирни n=15	појединачни n=3	збирни n=23	појединачни n=4	збирни n=15	појединачни n=3	збирни n=23
Линолна	18,2	0,6	17,1	3,2 ± 3,6 3,2 112%	24,5	6,4 ± 9,4 2,0 146%	4,5	2,8 ± 0,4 1,7 22%	3,8
Дихомо-гама Линолеинска	20,3	1,2	1,7	/	2,7	2,2 ± 3,2 0,7 149%	0,1	8,0 ± 7,2 9,6 91%	0,1
Арахидонска	20,4	/	1,4	13,2 ± 18,7 13,2 141%	3,7	30,1 ± 19,2 33,29 62%	0,3	43,0 ± 5,3 42,2 13%	0,2
Еикозапентаенска	20,5	/	0,1	/	0,2	/	/	/	/
Докозатетраенска	22,4	0,4	1,2	0,2 ± 0,1 0,2 47%	0,8	0,5 ± 0,1 0,5 18%	/	0,0 ± 0,1 0,0 173%	/
Докозапентаенска	22,5	/	0,7	/	1,0	0,3 ± 0,4 0,2 124%	/	/	/
Докозахексаенска	22,6	/	0,1	0,2 ± 0,3 0,2 141%	0,3	/	/	0,0 ± 0,1 0,0 173%	/

Приказани су средња вредност ± стандардна девијација и медијана (коса слова). Сива слова: коефицијент варијације



Слика 3.24. Процент масних киселина у фосфолипидима збирних узорака серума и CIC здраве телади и телади са бронхопнеумонијом; поређење вредности у серумима и CIC.



Слика 3.25. Процент масних киселина у фосфолипидима збирних узорака серума и S1C здраве телади и телади са бронхопнеумонијом; поређење вредности код здраве и болесне телади.

Табела 3. 21. Релативна промена садржаја масних киселина у фосфолипидима збирних узорака серума и СИС телади са бронхопмеумонијом.

Промена садржаја масних киселина у фосфолипидима					
Масне киселине	Број С атома	СИС здрави / серум здрави	СИС болесни / серум болесни	серум болесни / серум здрави	СИС болесни / СИС здрави
Миристинска	14,0	1,9	7,7	0,2	0,9
Палмитинска	16,0	1,1	0,7	1,3	0,8
Палмитолеинска	16,1	1,6	11,2	0,2	1,0
Стеаринска	18,0	0,6	0,2	2,0	0,7
Олеинска	18,1	1,4	3,3	0,5	1,1
Вакценска	18,1n-7	1,4	3,5	0,4	1,1
Линолна	18,2	0,3	0,2	1,4	0,8
Дихомо-гама линолеинска	20,3	0,1	/	1,6	1,0
Арахидонска	20,4	0,2	0,1	2,6	0,7
Еикозапентаенска	20,5	/	/	2,0	/
Докозатетраенска	22,4	/	/	0,7	/
Докозапентаенска	22,5	/	/	1,4	/
Докозахексаенска	22,6	/	/	3,0	/

3.1.6 Степен оксидативних оштећења липида и протеина крвног серума и СИС и антиоксидативни статус крвног серума

За разлику од великог броја података код инфламаторних болести плућа људи и експерименталних животиња, подаци о експресији маркера оксидативног стреса у болестима преживара су ретки и не увек конзистентни [170, 171]. У једној недавно објављеној студији, показано је да су респираторне болести говеда праћене повећаном пероксидацијом липида, уз истовремено смањење активности компоненти система антиоксидативне заштите (супероксиддисмутазе, редукованог глутатиона и каталазе) [172].

Код телади са благим формама бронхопнеумоније, које смо анализирали у овој студији, нисмо детектовали повишен ниво оксидативних оштећења липида и протеина. Антиоксидативни капацитет серума мерен АВТS методом није се разликовао код здраве и болесне телади. Међутим, FRAP методом смо показали да су болесна телада имала повишен антиоксидативни капацитет (табела 3.22). Сматрамо да повишен антиоксидативни капацитет представља још један од адаптивних механизма који ова телада развијају у одговору на узрочнике бронхопнеумоније. Код људи оксидовани липиди су нађени у СИС у инфламаторним болестима људи [121]. Спречавање акумулације оксидованих липида у имунокомплексе код телади са благим формама бронхопнеумоније би могао да буде један од механизма одбране од инфламаторних оштећења плућа.

Табела 3.22. Степен оксидације липида и протеина серума и СИС и антиоксидативни капацитет серума телади са бронхопнеумонијом.

	Серум		СИС	
	здрави	болесни	здрави	болесни
Степен оксидације липида и протеина				
MDA (mmol/l)	31,3 ± 5,94 30,9	29,9 ± 8,68 31,2	1,1 ± 0,5 1,0	2,2 ± 1,5 1,9
AAOP (μmol/l) (μmol/l)	23,7 ± 5,5 23,4	22,1 ± 4,9 21,9	1,0 ± 0,9 0,6	0,9 ± 0,7 0,8
AAOP (μmol/mg протеина)	0,4 ± 0,1 0,4	0,4 ± 0,2 0,3		
Антиоксидативни капацитет				
FRAP (mmol/l)	0,40 ± 0,02 0,39	0,49 ± 0,01*		
ABTS (mmol/l)	4,43 ± 0,07 4,43	4,36 ± 0,07 4,39		

Приказани су средња вредност ± стандардна девијација и медијана (коса слова). (*) статистички значајна разлика између здраве и болесне телади (p<0,001).

3.2 In vitro испитивање утицаја СИС здраве телади и телади са бронхопнеумонијом на функцију гранулоцита и периферне крви здраве телади

Формирање имунокомплекса је неопходан услов за елиминацију антигена из организма. Имунокомплекси су и снажни имуномодулатори који, везујући се за рецепторе на бројним ћелијама од значаја за функционисање имунског одговора, могу да покрену или про- или антиинфламаторну реакцију, зависно од специфичних фактора (антигени, имунокомплекси, ћелије, ROS, цитокини, екстраћелијски матрикс) који постоје на месту инфламације [41, 74].

Бронхопнеумоније телади јесу праћене повећаним нивоом СИС [13, 16, 138] али имуномодулаторна улога ових СИС до сада није испитивана. Ми смо у овом раду показали да се СИС телади са бронхопнеумонијом од СИС здраве телади разликују по саставу протеинских и липидних конституената. Да би показали да ли су СИС телади активни као регулатори имунског одговора, анализирали само њихов утицај на функцију гранулоцита и моноклеарних ћелија периферне крви здраве телади *in*

vitro. Такође, анализирали смо разлике у функционалном капацитету СИС здраве и болесне телади. Код здравих животиња, леукоцити у циркулацији налазе се у стању мировања. У случају инфекције, ови мирујући леукоцити бивају привучени у ткиво плућа где се под утицајем фактора микросредине активирају и постају зреле ефекторне ћелије [91]. Ми смо пошли од претпоставке да су СИС телади функционално активни и да могу да активирају мирујуће леукоците и промене њихово функционално стање. Испитивали смо утицај СИС на адхезију, синтезу ROS, вијабилност, апоптозу и пролиферацију леукоцита. Телад у овој студији су припадали холштајн фризијској раси говеда која представља високо укрштenu расу (разлике у IgG алоптипovима скоро да и нема [58]), због чега су у експериментима, осим насумично изабраних појединачних узорака СИС, могли бити коришћени и пулови направљени од СИС из серума 23 болесна телета и од СИС из серума 16 здравих животиња.

3.2.1 Испитивање ефекта СИС на адхезију MNC и гранулоцита

Активација леукоцита је праћена њиховом повећаном адхезијом за пластику (полистирен) [173] и ми смо испитивањем утицаја СИС здраве и болесне телади од бронхопнеумоније на адхезивност леукоцита периферне крви индиректно процењивали да ли СИС доводе до активације ових ћелија. Анализа је рађена колориметријским тестом, које се занима на одређивању броја адхерираних ћелија на основу интензитета бојења ћелија кристал виолетом бојом специфичном за ДНК [174].

Резултати приказани у табели 3.23 показују да гранулоцити и MNC на стимулацију РМА и СИС или нису одговарали променом или су реаговали повећаном или смањеном адхезијом. Овај ефекат је зависио од СИС, али и од донора респондерских ћелија.

Табела 3.23. Утицај СИС здраве телади и телади оболеле од бронхопнеумоније на адхезију гранулоцита и МНС.

адхезија гранулоцита (%)					
	PMA	CICz	CICb	CICz \diamond	CICb \diamond
	100	100	100	100	117
	100	84	84	116	100
	100	81	75	138	112
	100	100	100	117	147
	341 \diamond			125	160
				100	126
$x \pm SD$	148 \pm 96	91 \pm 9	90 \pm 11	116 \pm 13	127 \pm 21
Me	100	92	92	117	122
адхезија МНС (%)					
	PMA	CICz	CICb	CICz \diamond	CICb \diamond
	87	100	100	43	118
	100	100	100	118	119
	100	100	100	100	100
	100	100	100	100	124
	176 \diamond			100	139
				106	125
$x \pm SD$	113 \pm 32	100	100	95 \pm 24	121 \pm 12
Me	100	100	100	100	122

CICz: збирни узорак СИС здраве телади; CICb збирни узорак СИС телади са бронхопнеумонијом; СИС испитиване на ћелијама четири телета. \diamond МНС или гранулоцити једног телета стимулирани са по шест појединачних насумично изабраних СИС здраве (CICz \diamond) и СИС болесне телади (CICb \diamond). Вредност од 100% представља ниво спонтане адхезије.

3.2.2 Испитивање модулаторне улоге СИС на синтезу ROS у МНС и гранулоцитима

Активација леукоцита је праћена повећаном синтезом ROS. Повећана синтеза ROS у ћелијама плућа се детектује код мишева, код којих је акутно оштећење плућа индуковано експериментално апликацијом имунокомплекса [91]. Ми смо у овом раду испитивали утицај СИС на модулацију синтезе ROS у мирујућим МНС и гранулоцитима здраве телади колориметријским тестом редукције NBT [174]. Редукција NBT је резултат хемијске реакције између жуто обојеног, у води растворног NBT и O₂⁻ који се продукује у реакцији респираторног праска,

каталитичким деловањем NADPH оксидазе. Оксидаза катализује реакцију преноса електрона са NADPH на NBT који се редукује у нерастворни тамно плави формазан и након солубилизације квантификује спектрофотометријски.

Резултати приказани у табели 3.24 показују да PMA и збирни узорци CIC здраве и болесне телади индукују повећану синтезу ROS у MNC телета али да је стимулаторни ефекат CIC био мањи од ефекта PMA. Појединачни CIC су или стимулисали или нису утицали на синтезу ROS у MNC једног донора. Гранулоцити су на стимулацију PMA одговарали повећаном синтезом ROS. Међутим, утицај збирних узорака CIC је зависио од донора ћелија и био је или инхибиторан или стимулаторан. Од шест испитиваних појединачних узорака, само два CIC здраве и два CIC болесне телади, су стимулисала синтезу ROS у гранулоцитима, док су остали били без ефекта.

Табела 3.24. Утицај CIC здраве телади и телади оболеле од бронхопнеумоније на синтезу ROS у гранулоцитима и MNC.

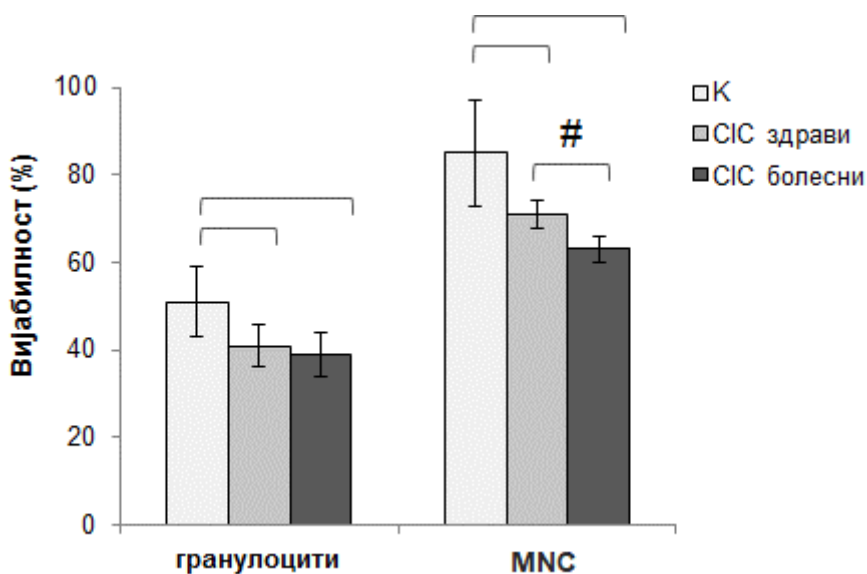
NBT гранулоцити %				
PMA	CICz	CICb	CICz \diamond	CICb \diamond
615	70	51	153	128
1061	156	129	100	100
615	67	100	133	190
495	173	151	119	111
608 \diamond			167	118
			121	178
679 \pm 196	117 \pm 48	108 \pm 37	132 \pm 22	138 \pm 34
615	113	115	127	123
NBT MNC %				
PMA	CICz	CICb	CICz \diamond	CICb \diamond
573	156	186	154	146
514	132	128	190	133
384	165	148	113	279
572	117	115	192	174
422			249	159
544 \diamond			123	197
502 \pm 73	143 \pm 19	144 \pm 27	170 \pm 46	181 \pm 48
529	144	138	172	167

CICz: збирни узорак CIC здраве телади; CICb збирни узорак CIC телади са бронхопнеумонијом; CIC испитиване на ћелијама четири телета. \diamond MNC или гранулоцити једног телета стимулисани са по шест појединачних насумично изабраних CIC здраве (CICz \diamond) и CIC болесне телади (CICb \diamond). Вредност од 100% представља ниво спонтане синтезе ROS.

3.2.3 Испитивање ефекта СИС на вијабилност МНС и гранулоцита

Утицај на вијабилност гранулоцита и МНС у краткотрајним културама испитивана је колориметријским МТТ тестом [174]. Тест је заснован на реакцији редукције жуто обојене тетразолијумске соли МТТ у митохондријама већим бројем дихидрогеназа, при чему долази до цепања прстена и појаве формастана карактеристичне љубичасте боје који се након солубилизације квантификује спектрофотометријски. МТТ могу да редукују само активне митохондрије живих ћелија, стога је овај тест погодан за мерење броја вијабилних ћелија у културама.

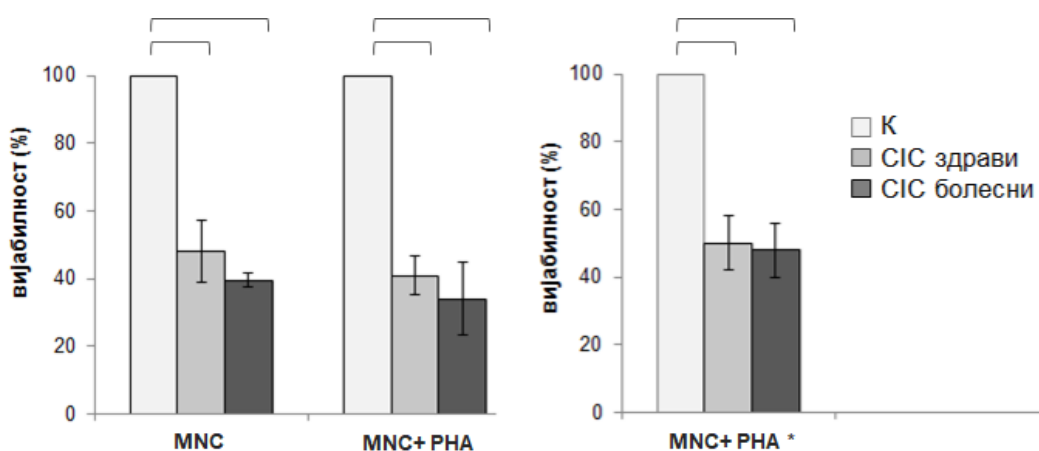
Након 48h у култури, реактивност гранулоцита у МТТ тесту опада на 50% од почетне вредности, а СИС додатно редукују вијабилност на 40% од почетне вредности. У истим културама вијабилност МНС је била само благо смањена (за 15% од почетне вредности). Као и код гранулоцита, СИС су додатно смањивали вијабилност али је ефекат СИС болесне телади био израженији (слика 3.25).



Слика 3.25. Утицај СИС (појединачни узорци) телади са бронхопнеумонијом и здраве телади на вијабилност гранулоцита и МНС здраве телади 48h у култури. Хоризонтална линија: статистички значајна разлика у вијабилности између контролних и ћелија у култури са СИС; Хоризонтална линија са #: статистички значајна разлика у вијабилности МНС култивисаних са СИС здраве и болесне телади.

Након 72h присуство СИС је снажно смањивало вијабилност и нестимулисаних МНС и МНС стимулираних РНА, али се утицај СИС здраве и болесне телади није разликовао (слика 3.26).

Како смањење вијабилности ћелија може бити последица индукције апоптозе или заустављања деобе, у следећим експериментима смо испитивали утицај СИС здраве и болесне телади на апоптозу гранулоцита и апоптозу МНС, ћелијски циклус и пролиферацију нестимулисаних МНС и МНС стимулираних РНА.



Слика 3.26. Утицај СИС телади са бронхопнеумонијом и здраве телади на вијабилност нестимулисаних МНС и МНС стимулираних РНА 72h у култури. МНС и МНС+ РНА: МНС третиране са збирним узорцима СИС; МНС+ РНА*: МНС третиране са шест појединачних узорака СИС; Хоризонтална линија: статистички значајна разлика у вијабилности између контролних и ћелија у култури са СИС.

3.2.4. Испитивање ефекта СИС на апоптозу МНС и гранулоцита у 24h и 48h културама

МНС и гранулоцити из пуне крви здраве телади су раздвајани центрифугирањем на комерцијалном Lymphoprep раствору, густине 1,077 g/cm³. Овај раствор је прилагођен густини ћелија хумане периферне крви и његовом применом није било могуће подједнако ефикасно раздвојити и ћелије периферне крви телета, тако да је интерфазни слој ћелија, осим мононуклеара, садржао и гранулоците (тзв.

гранулоците ниске густине) у значајном проценту. Процент различитих ћелијских типова у 24h и 48h културама приказани су у табели 3.25.

Табела 3.25. Процент ћелијских популација у 24h и 48h културама гранулоцита и MNC. Проточна цитометрија, ћелије идентификоване на основу FSC/SSC вредности.

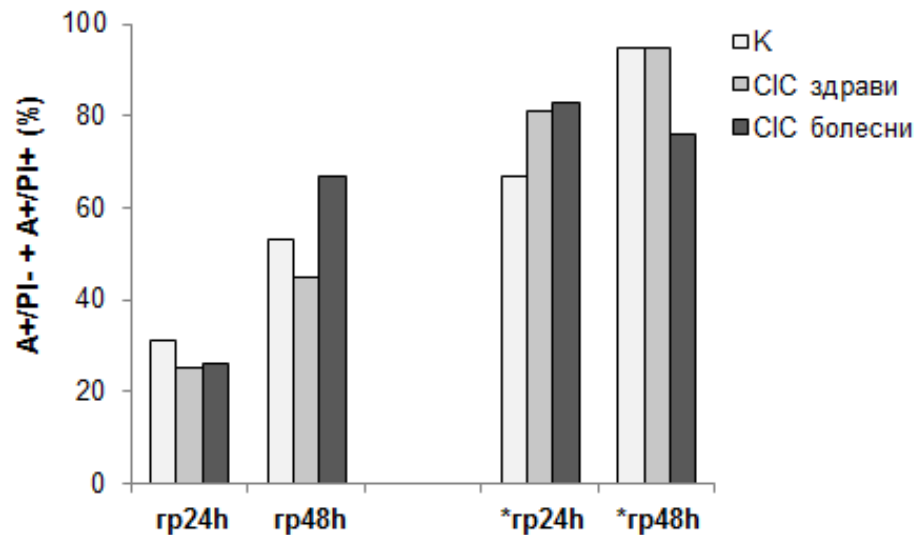
	мали лимф.	велики лимф.	гранулоцити
	интерфазна зона / нестимулисане MNC		
24h	64 ± 6	18 ± 3	18 ± 4
48h	40 ± 7	43 ± 4	18 ± 3
	интерфазна зона / нестимулисане MNC		
24h	55 ± 8	43 ± 8	2 ± 1
48h	31 ± 10	58 ± 10	10 ± 2
	талог / гранулоцити		
24h	8 ± 2	3 ± 1	89 ± 2
48h	9 ± 3	15 ± 4	80 ± 2

Ниво апоптозе је анализиран проточном цитометријом, при чему је одређен проценат неапоптотичних-вијабилних ћелија и проценат ћелија у раним и касним фазама апоптозе. Неапоптотичне ћелије нису везивале ни Annexin V-FITC, ни PI. Рано апоптотичне ћелије су за своје мембране везивале само Annexin V-FITC, а касно апоптотичне ћелије су везивале Annexin V-FITC и интернализовале PI [175]. На основу резултата двоструког обележавања гранулоцита анексин V-FITC/PI бојењем и проточном цитометријом је показано да се проценат спонтано апоптотичних ћелија и ефекат CIC разликовао у популацијама гранулоцита које су се након диференцијаног центрифугирања издвајале у талогу и у интерфазној зони (слика 3.27, табела 3.26).

Процент спонтано апоптотичких ћелија је био већи у гранулоцитима у интерфази, који представљају гранулоците у кокултури са MNC. Након 24h у овим гранулоцитима су доминирале раноапоптотичне (A+PI-), а након 48h касноапоптотичне (A+PI+) ћелије. Присуство CIC и здраве и болесне телади је повећавало проценат апоптотичких ћелија након 24h, док су након 48h само CIC болесне телади додатно смањивали апоптозу.

У културама гранулоцита издвојених у талогу и након 24h и након 48h доминирали су раноапоптотични гранулоцити (A+PI-). Ефекат CIC на ове гранулоците је био супротан од ефекта на гранулоците издвојене у интерфази.

Присуство СИС и здраве и болесне телади је смањивало апоптозу након 24h, а након 48h антиапоптотички ефекат су имали само СИС болесне телади.



Слика 3.27. Утицај СИС (збирни узорци) телади са бронхопнеумонијом и здраве телади на апоптозу гранулоцита здраве телади у 24h и 48h у култури. (гр) гранулоцити из талога након добијеног центрифугирања пуне крви на Lymphoprep-у; (*гр) гранулоцити из ћелија у интерфазној зони која се издваја након центрифугирања пуне крви на Lymphoprep-у. Проточна цитометрија, Annexin V-FITC/PI тест. Резултати једног репрезентативног експеримента.

У популацији MNC телади, на основу величине и гранулираности (вредности FSC и SSC), издвајале су се популације мањих и већих ћелија које смо означили као мали и велики лимфоцити (табела 3.25).

У културама нестимулисаних MNC, апоптоза је била мања у популацији малих лимфоцита (слика 3.28, табела 3.27). У групи малих лимфоцита проценат апоптотичних ћелија је након 48h био већи него након 24h, али су у оба термина доминирале раноапоптотичне ћелије (AI+PI-). Присуство обе категорије СИС је повањавало проценат апоптотичних малих лимфоцита само након 24h. Након 48h, СИС присуство болесне телади је смањивало проценат апоптотичних ћелија. У групи великих лимфоцита, проценат апоптотичних ћелија је био висок у оба термина. Након 24h доминирале су раноапоптотичне ћелије (AI+PI-), које су после 48h прелазиле у касноапоптотичне ћелије (AI+PI). Ефекат СИС након 24h није био изражен, а након

48h само су СИС болесне телади смањивали проценат апоптотичких великих лимфоцита.

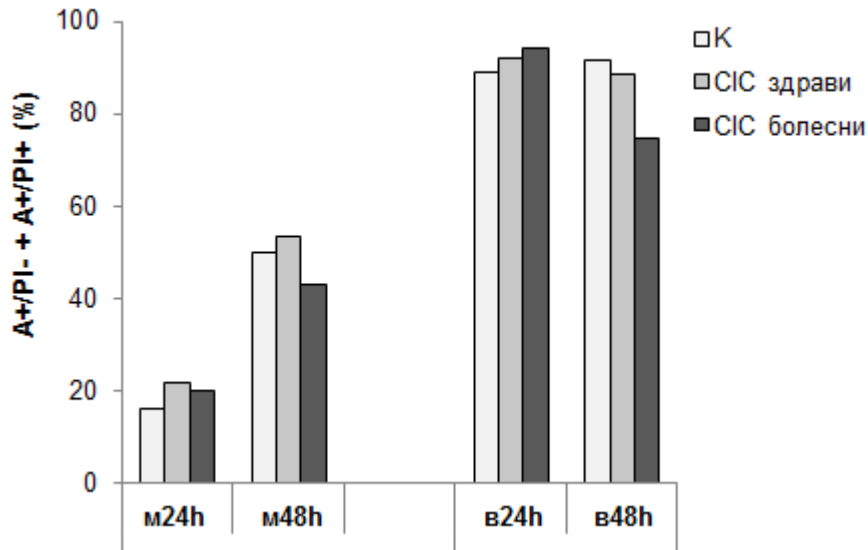
Табела 3.26. Процент вијабилних и апоптотичних гранулоцита у 24h и 48h културама. Проточна цитометрија, анексин V-FITC/PI тест.

		Гранулоцити				
		вијабилни		апоптотични		
		A-PI- %	Укупни %	A+PI- %	A+PI+ %	рел. %
Талог 24h	К	69	31	30	1	100
	СИСz	75	25	23	2	81
	СИСb	74	26	24	2	84
Талог 48h	К	50	50	40	10	100
	СИСz	47	53	45	8	106
	СИСb	55	45	35	8	90
Интерфаза 24h	К	33	67	63	4	100
	СИСz	19	81	63	18	121
	СИСb	17	83	69	14	124
Интерфаза 48h	К	5	95	38	57	100
	СИСz	5	95	25	70	100
	СИСb	24	76	23	53	80

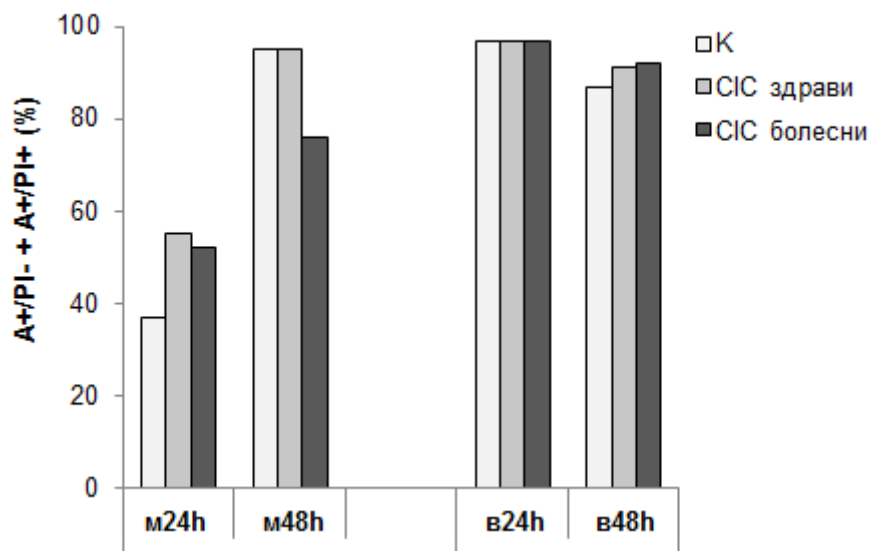
К: Контролне културе, ћелије у RPMI/FBS медијуму; талог: гранулоцити из талога након добијеног центрифугирања пуне крви на Lymphorger-у; интерфаза: гранулоцити из ћелија у интерфазној зони која се издваја након центрифугирања пуне крви на Lymphorger-у; ћелије култивисане са збирним узорцима СИС здраве телади (СИСz) и телади са бронхопнеумонијом (СИСb); (рел. %) промена броја апоптотичних ћелија у културама са СИС у односу на контролне културе. Резултати једног реперезентативног експеримента.

И у културама стимулираних MNC апоптоза је била мање изражена у популацији малих лимфоцита (слика 3.29, табела 3.27), али је била већа у односу на нестимулисане мале MNC. У популацији малих стимулираних MNC након 24h доминирале су раноапоптотичне ћелије (AI+PI-), које су после 48h прелазиле у касноапоптотичне ћелије (AI+PI). Обе категорије СИС су повећавале проценат апоптотичних малих лимфоцита након 24h. Након 48h, само СИС болесне телади су смањивали проценат апоптотичних ћелија. Прелаз од раноапоптотичних ка касно апоптотичним ћелијама је била одлика и великих стимулираних MNC, али у овој

групи ћелија CIC нису утицали на апоптозу након 24h, а након 48h ефекат је био благо инхибиторан.



Слика 3.28. Утицај CIC (збирни узорци) телади са бронхопнеумонијом и здраве телади на апоптозу нестимулисаних MNC здраве телади у 24h и 48h култури. (м) мали лимфоцити; (в) велики лимфоцити. Проточна цитометрија, Annexin V-FITC/PI тест. Резултати једног реперезентативног експеримента.



Слика 3.29. Утицај CIC (збирни узорци) телади са бронхопнеумонијом и здраве телади на апоптозу MNC здраве телади стимулираних РНА у 24h и 48h култури. (м) мали лимфоцити; (в) велики лимфоцити. Проточна цитометрија, Annexin V-FITC/PI тест. Резултати једног реперезентативног експеримента.

Табела 3.27. Процент вијабилних и апоптотичних популација МНС у 24h и 48h културама. Проточна цитометрија, анексин V-FITC/PI тест.

		вијабилне	апоптотичне			
		A-PI- %	укупни %	A+PI- %	A+PI- %	рел. %
нестимулисане МНС						
мали лимф.	К	84	16	10	6	100
24h	СICz	78	22	15	7	138
	СICb	80	20	14	6	125
мали лимф.	К	50	50	40	10	100
48h	СICz	47	53	45	8	107
	СICb	57	43	35	8	86
велики лимф.	К	11	89	65	23	100
24h	СICz	8	92	65	27	103
	СICb	6	94	69	14	106
велики лимф.	К	8	92	8	84	100
48h	СICz	11	89	5	83	97
	СICb	25	75	3	72	82
МНС стимулисане РНА						
мали лимф.	К	63	37	28	9	100
24h	СICz	45	55	45	10	149
	СICb	48	52	38	14	141
мали лимф.	К	5	95	38	57	100
48h	СICz	5	95	25	70	100
	СICb	24	76	23	53	80
велики лимф.	К	3	97	58	39	100
24h	СICz	3	97	51	46	100
	СICb	3	97	46	51	100
велики лимф.	К	13	87	1	86	100
48h	СICz	9	91	1	90	105
	СICb	8	92	1	91	106

К: Контролне културе, ћелије у RPMI/FBS медијуму; МНС из интерфазног прстена култивисане са и без РНА; ћелије култивисане са збирним узорцима СIС здраве телади (СIСz) и телади са бронхопнеумонијом (СIСb); (рел. %) промена броја апоптотичних ћелија у културама са СIС, у односу на контролне културе. Резултати једног репрезентативног експеримента.

3.2.5 Испитивање ефекта СІС на ћелијски циклус МНС

Количина ДНК у ћелији се мења зависно од ћелијског циклуса и у фази G0/G1 је најнижа, постепено повећава се кроз S фазу да би у G2 фази након завршетка репликације ДНК била воструко већа него на почетку ћелијског циклуса [176]. Утицај СІС на ћелијски циклус МНС у тродневној култури је анализиран методом проточне цитометрије, на основу количине ДНК која је везивала PI.

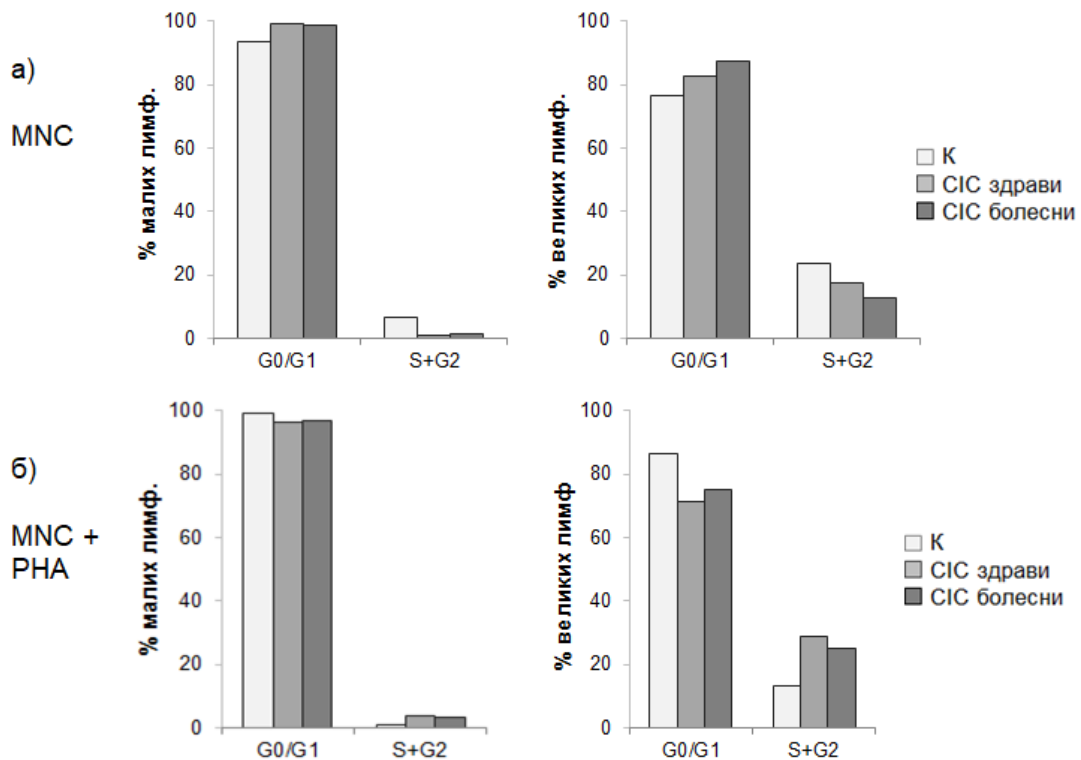
У популацији МНС телади на основу величине и гранулираности (вредности FSC и SSC) издвајале су се популације малих апоптотичних ћелија, и две популације вијабилних ћелија које смо означили као мали и велики лимфоцити (табела 3.28). Процент апоптотичних ћелија је био најнижи у култури нестимулисаних МНС и растао је у културама СІС стимулираним РНА и СІС. У стимулираним МНС гајеним у присуству СІС скоро сви мали лимфоцити су били апоптотични (табела 3.29).

Табела 3.28. Процент ћелијских популација у 72h културама МНС. Проточна цитометрија, ћелије идентификоване на основу FSC/SSC вредности и бојења PI.

		апоптотични (%)		вијабилни (%)	
		мали лимф.	мали лимф.	велики лимф.	
MNC	K	25	47	27	
	СІСz	54	28	19	
	СІСb	41	32	27	
MNC + РНА	K	37	41	22	
	СІСz	100	0	13	
	СІСb	100	0	10	

K: Контролне културе, ћелије у RPMI/FBS медијуму; МНС из интерфазног прстена; ћелије култивисане са збирним узорцима СІС здраве телади (СІСz) и телади са бронхопнеумонијом (СІСb) култивисане са и без РНА. Резултати једног репрезентативног експеримента.

У свим популацијама МНС највећи број ћелија се налазио у G0/G1 фази ћелијског циклуса, али је у популацији великих лимфоцита проценат ћелија у G0/G1 фази био мањи. СІС и здраве и болесне телади су нестимулисане МНС задржавале у G0/G1 фази, док је ефекат на стимулисане МНС са РНА био супротан (слика 3.30, табела 3.29).



Слика 3.30. Утицај СІС (збирни узорци) телади са бронхопнеумонијом и здраве телади на ћелијски циклус популација а) нестимулисаних МНС и б) РНА стимулираних МНС здравог телади. Проточна цитометрија, бојење PI тест. Резултати једног реперезентативног експеримента.

Табела 3.29. Процент ћелијских популација у различитим фазама ћелијског циклуса у 72h културама MNC. Проточна цитометрија, бојење PI.

		Go/G1	S+G2	<i>рел. Go/G1</i>	<i>рел. S+G2</i>
		%	%	%	%
нестимулисане MNC					
мали лимф.	К	93	7	100	100
	CICz	99	1	106	14
	CICb	99	1	106	14
велики лимф.	К	76	24	100	100
	CICz	83	18	109	75
	CICb	87	13	114	54
MNC стимулисане PHA					
мали лимф.	К	99	1	100	100
	CICz	96	4	97	400
	CICb	97	3	98	300
велики лимф.	К	87	13	100	100
	CICz	71	29	82	223
	CICb	75	25	91	192

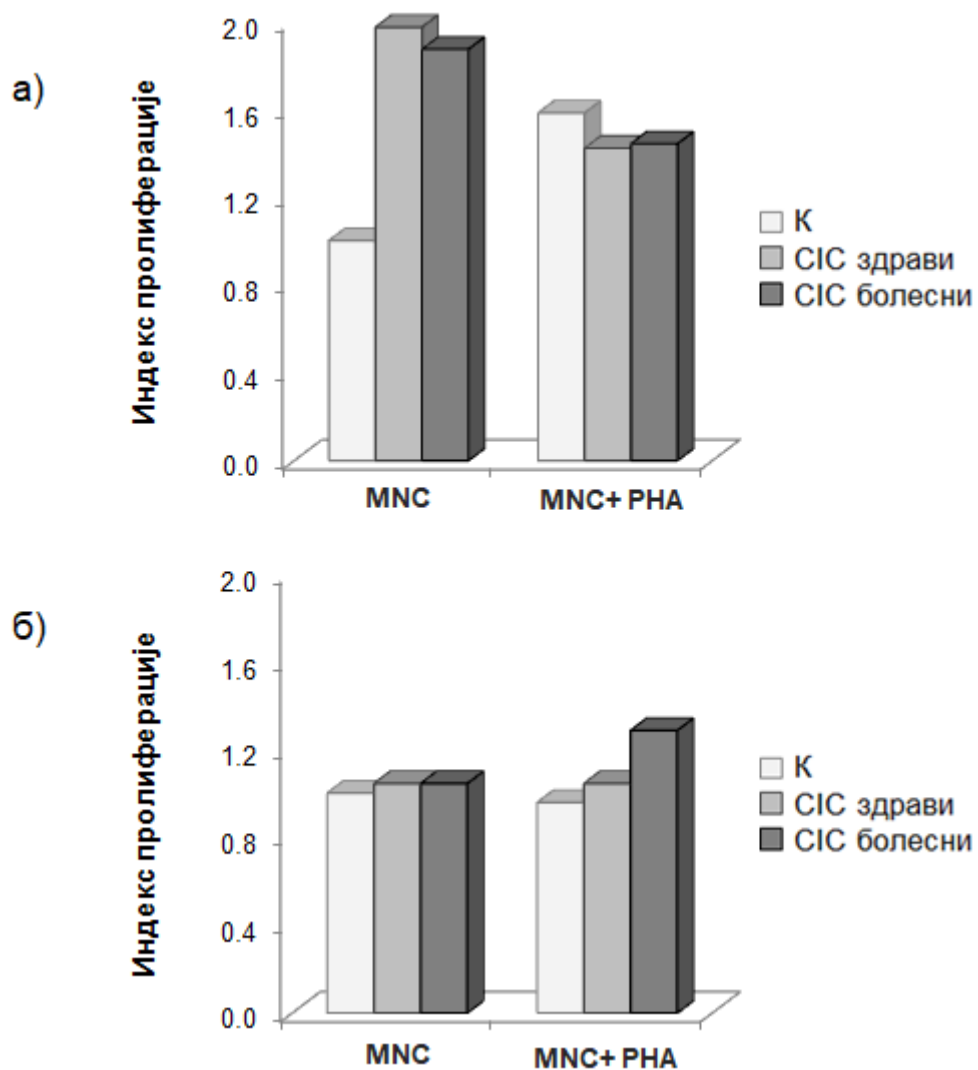
К: Контролне културе, ћелије у RPMI/FCS медијуму; ћелије култивисане са збирним узорцима CIC здраве телади (CICz) и телади са бронхопнеумонијом (CICb) култивисане са и без PHA. (рел. %) Промена броја ћелија у културама са CIC у односу на контролне културе. Резултати једног реперезентативног експеримента.

3.2.6 Испитивање ефекта CIC на пролиферацију MNC

Степен пролиферације MNC је анализиран на основу смањења интензитета CFSE флуоресценце у шестодневним културама. Ниво флуоресценце у култивисаним MNC је анализиран проточном цитометријом, а пролиферативни индекс је израчунат по формули која су дали [177].

Резултати су показали да је утицај CIC на пролиферацију MNC зависио од здравља донора CIC, али и од укупног имунолошког статуса донора MNC и степена активације MNC (слика 3.31). Код телади чији су лимфоцити пролиферисали у одговору на стимулацију PHA, CIC су благо смањивали пролиферативни индекс нестимулисаних MNC. Код истог донора, CIC су стимулисали пролиферацију MNC култивисаних без PHA. Код телади чији лимфоцити нису пролиферисали у одговору

на стимулацију РНА, само СИС болесне телади су повећали пролиферативни индекс и то само МНС стимулираних РНА.



Слика 3.31. Утицај СИС (збирни узорци) телади са бронхопнеумонијом и здраве телади на пролиферацију нестимулисаних МНС и РНА стимулираних МНС два здрава телета. а) МНС који су на стимулацију РНА одговорили повећаном пролиферацијом. б) МНС који на стимулацију РНА нису одговорили повећаном пролиферацијом.

3.2.7 Коментар резултата *in vitro* испитивања ефекта СИС телади са бронхопнеумонијом и здраве телади на функционалне одлике леукоцита периферне крви здраве телади

Резултати ове докторске дисертације показују да се СИС тромесечне телади оболеле од благе форме бронхопнеумоније изазване бактеријом *P. multocida* по величини и по саставу протеинских и липидних конституената разликују од СИС здраве телади исте старости. СИС оболеле телади су модулисала адхезију, синтезу ROS, вијабилност у краткотрајним културама, апоптозу, ћелијски циклус и пролиферацију мирујућих леукоцита периферне крви здраве телади, а њихов ефекат није увек био једнак ефекту СИС здраве телади. У већини тестова коришћених у овом раду, функционално стање ћелија донора је било од значаја за резултате тестова. Иако су сви донори респондерских ћелија била здрава телада, њихов имунски систем није неактиван, већ је у сталној интеракцији са антигенима/патогенима средине што се одражава на функционално стање ћелија које, иако у физиолошким границама, није истоветно, па је и различити одговор на стимулацију очекиван. Сличне неуниформности у реаговању показују и ћелије здравих људи [177].

Адхезија лимфоцита периферне крви за ендотелне ћелије активираних инфламаторним медијаторима је први корак у њиховој активацији и праћен је синтезом ROS. Код гранулоцита крвава стимулација PMA је значајно повећала адхезију за пластику [17]. Међутим, гранулоцити телади нису повећавали адхезивност након стимулације PMA што је указало да они нису потпуно функционално компетентни. Ефекат СИС и здраве и болесне телади на адхезивност гранулоцита је зависио и од донора ћелија. СИС нису значајно мењали адхезивност MNC телади, као ни MNC крвава [17]. MNC и гранулоцити здраве телади су на стимулацију PMA одговарали повећаном синтезом ROS али је ниво синтезе био нижи, него у ћелијама здравих одраслих говеда [17]. У присуству СИС и здраве и болесне телади, MNC и гранулоцити телади су повећано синтетисали ROS, али је одговор MNC био нешто снажнији. Истраживања спроведена на моделима глодара су показала да је инфламација плућа изазвана депоновањем IgG-албумин имунокомплекса посредована неутрофилима [179]. Наши резултати су показали да СИС много снажније стимулишу синтезу ROS у гранулоцитима крвава, него у гранилоцитима телета, и да је само код гранулоцита крвава синтеза ROS била већа у

присуству СИС болесне телади [17]. И Higuchi и Nagahata [180] су показали да IgG агрегирани топлотом (*in vitro* аналог имунокомплекса) индукују значајно нижу продукцију супероксида у гранулоцитима телади. Ову особину гранулоцита телади можемо да објаснимо добро познатом функционалном незрелошћу имунског система младих јединки [142].

Инфламација у плућима може бити регулисана и утицајем на дужину живота хематопоетских и нехематопоетских ћелија плућа [91]. У акутним инфекцијама преживљавање гранулоцита може бити продужено због потребе за елиминацијом патогена, а елиминација гранулоцита апоптозом је један од механизма резолуције инфламације [181]. Међутим, исти аутор наводи и да апоптоза и некроза гранулоцита и следствено ослобађање садржаја гранула може да појачава инфламацију, тако да функција апоптозе у инфламацији плућа није до краја објашњена. Gamberale и сар. [182] су показали да имунокомплекси модулишу апоптозу гранулоцита, али да ефекат зависи од њихове структуре. Преципитирајући имунокомплекси стимулишу апоптозу гранулоцита, а солубилни је одлажу. Hart и сар. [183] су показали да имунокомплекси везивањем за FcγRIIA на апоптотичким неутрофилима повећавају њихову фагоцитозу од стране макрофага и стимулишу ослобађање проинфламаторних IL-1 и IL-6. Међутим, Miles и сар. [184] су показали да апоптотички неутрофили секретују анти-инфламаторне факторе који инхибирају секрецију про-инфламаторних цитокина, али не утичу на деструкцију патогена. Ми смо показали да СИС и здраве и болесне телади у истој мери смањују вијабилност гранулоцита телади, док је на гранулоците крава смањење вијабилности у присуству СИС болесне телади било нешто веће [17]. Каква је улога смањења вијабилности гранулоцита телади у присуству СИС није познато. Такође, није познат ни механизам смањења вијабилности гранулоцита. Ми смо испитивали да ли је апоптоза један од механизма смањења вијабилности гранулоцита. Процент вијабилних гранулоцита детектован у 48h културама, детектован на основу реактивности са анексином V и PI је био исти као проценат добијен МТТ тестом. Међутим, ефекат СИС је био проапоптотичан само на гранулоците које су култивисане са MNC. У чистим културама гранулоцита, присуство и здраве и болесне телади, је смањивало проценат апоптотичких ћелија након 24h, док су након 48h овај ефекат имали само СИС болесне телади.

Говеђе MNC су хетерогена популација ћелија у чијем саставу се налазе већи број ћелијских типова (моноцити, Т и В лимфоцити, NK ћелије, дендритичне ћелије),

сваки са својим подтипovima и са ћелијама у различитим активационим стањима [185, 186, 187]. MNC људи и глодара експримирају и активационе FcγR (FcγRI и FcγRIIa на моноцитима, и FcγRIIc и FcγRIIIa на моноцитима и NK ћелијама) и инхибиторне FcγR (FcγRIIc на Б лимфоцитима и субпопулацијама моноцита) [74, 188]. Утицај IgG имунокомплекса и FcγR интраћелијске сигнализације у плућима је анализиран само на моделима глодара, који су показали да FcγRI и FcγRIII имају проинфламаторну улогу, а да FcγRII делују антиинфламаторно [189]. Збирни одговор на стимулацију имунокомплексима је одређен међусобним односима ћелија и сигналних путева покренутим активацијом различитих FcγR [74]. Код говеда постоје FcγR хомологи хуманим FcγRI, FcγRII и FcγRIII [190]. Међутим, њихова ћелијска експресија и функција нису детаљно анализирани. Ми смо показали да је вијабилност MNC телади у 48h културама додатно смањена у присуству CIC и здраве и болесне телади, и да је ефекат болесне телади био израженији. CIC нису утицале на вијабилност MNC крава [16]. Ове разлике у осетљивости на CIC могле би да буду последица различите експресије FcγRII на MNC телади и крава [185, 191]. Такође, сматрамо да су вишеструки и наизглед супротни ефекти CIC на апоптозу, ћелијски циклус и пролиферацију MNC последица комплексног састава MNC и њихових многобројних ефекторских функција. Познато је да у ћелијском и цитокинском окружењу какво влада на месту инфламације, имунокомплекси као и други ћелијски и молекулски имунорегулатори, у сагласности са другим срединским факторима, могу да покрену потпуно супротне одговоре у зависности од тренутних потреба организма. Тако стимулација пролиферације нестимулисаних MNC CIC би могла бити од значаја у раним фазама болести када број антиген специфичних лимфоцита треба да се увећа. С друге стране, смањена вијабилност нарочито митоген стимулираних MNC и смањење њихове пролиферације би могла да има улогу у гашењу инфламације након елиминације патогена.

Резултати ове тезе показују да су CIC здраве телади и телади са бронхопнеумонијом функционално активни. Које од структурних компоненти CIC су одговорне за ову активност, да ли су оне ендогеног или екзогеног порекла, остаје да буде утврђено.

3.3 ЗАКЉУЧЦИ

На основу изложених циљева и представљених резултата, изведени су следећи закључци:

1. Из серума здраве и болесне телади изоловани су циркулишући имунокомплекси (CIC) преципитацијом полиетилен гликолом.
2. Телад са бронхопнеумонијом су, у односу на здраву телад, имала повећан ниво PEG преципитабилних CIC у крвном серуму.
3. CIC телади са бронхопнеумонијом су били већи. У CIC здраве телади највише су биле заступљене честице хидродиманичког радијуса од 225 ± 33 nm и 734 ± 174 nm. У CIC болесне телади најзаступљеније су биле честице од 1426 ± 291 nm.
4. Зета потенцијал CIC телади са бронхопнеумонијом је био незнатно (за 6%) већи од зета потенцијала CIC здраве телади.
5. У серумима телади са бронхопнеумонијом детектован је повишен ниво укупних протеина. Концентрација укупних протеина у CIC здраве и болесне телади се није разликовала. Концентрација γ и α глобулина била је повећана и у серумима и CIC болесне телади. Концентрација IgG и трансферина је била повишена у серумима али не и у CIC болесне телади.
6. IgG CIC, али и укупни IgG серума, IgG риванол-преципитабилних протеина серума и протеина серума изолованих ањонском хроматографијом су били електрофоретски хетерогени. Промена код болесне телади је детектована само на IgG изолованих ањонском хроматографијом, код које је детектован повећан садржај IgG највеће молекулске масе.
7. Афинитетном хроматографијом на протеин G и протеин A сефарози, из CIC, нефракционисаних серума, риванол-солубилних протеина серума и здраве и болесне телади изоловани су IgG са којима су копреципитирале и друге протеинске фракције. Искључиво са IgG из CIC су копреципитирале фракције од 80, 78 и 73 kDa.
8. И код здраве телади и код телади са бронхопнеумонијом садржај IgG2 у IgG CIC је био нижи од садржаја IgG2 у укупним IgG серума, IgG из риванол-солубилних протеина серума и протеина серума изолованих ањонском хроматографијом.
9. Разлика у гликозилацији IgG из CIC, нефракционисаних серума и риванол-преципитабилних протеина серума здраве и болесне телади није нађена.

Повишена гликозилација је детектована само у фракцији серумских IgG изолованих анијонском хроматографијом.

10. У серумима здраве и телади са бронхопнеумонијом детектовани су α (HDL)- и β (LDL) липопротеини и хиломикрони. У СИС здраве и болесне телади детектована је само једна фракција липопротеина широке електрофоретске покретљивости у пре- β , β и пост- β зони.
11. У серумима телади са бронхопнеумонијом концентрација триглицерида и холестерола у саставу HDL је била повишена, а концентрација LDL-холестерола смањена. Концентрација ових липида у СИС је била испод нивоа детекције.
12. У серумима и здраве телади и телади са бронхопнеумонијом доминирали су неутрални липиди који су чинили више од 80% укупних липида, док су у СИС доминирали фосфолипиди са уделом од 80%.
13. У фосфолипидима СИС олеинска киселина је била присутна у највећем проценту (60%), а само још палмитинска киселина је била у количини већој од 10%. У СИС телади са бронхопнеумонијом садржај олеинске и вакценске киселине је био благо повишен, садржај миристинске, палмитинске, стеаринске, линолне и арахидонске снижен, а садржај палмитолеинске и дихомо-гама линолеинске непромењен.
14. Ниво пероксидације липида серума и СИС здраве и телади са бронхопнеумонијом се није разликовао.
15. СИС и здраве телади и телади са бронхопнеумонијом су били функционално активни и модулисали су адхезију, синтезу реактивних кисеоничних једињења, вијабилност, апоптозу, ћелијски циклус и пролиферацију мирујућих леукоцита периферне крви здраве телади. Ефекат је био или стимулаторан или инхибиторан, зависно од структуре СИС условљене здрављем телади, и од функционалног стања и степена активације ћелија донора.
16. Добијени резултати указују да се СИС болесне телади по квантитативном и квалитативном саставу протеина и липида разликују од здраве телади чиме се могу објаснити и разлике у њиховом капацитету да *in vitro* модулишу функцију гранулоцита и MNC.

4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

4.1 Материјал

Као биолошки материјал у овој студији коришћени су крвни серуми и ћелије периферне крви тромесечних телића холштајн-фризијске расе, оба пола. Телад су рођена и гајена на Фарми „Ковилово“, Пољопривредног комбината „Београд“. Третман животиња које су биле укључене у ову студију био је у складу са Законом о добробити животиња Републике Србије.

У део студије која је за циљ имала квалитативну и квантитативну анализу СИС телади било је укључено 38 телића старих три месеца. Биолошки материјал за овај део студије је прикупљан у периоду децембар-фебруар када ниска температура и велика влажност ваздуха погодују јављању бронхопнеумоније. Телад укључену у студију је прегледао и дијагнозу бронхопнеумоније поставио доктор ветеринарске медицине. Клинички знаци који су оцењивани при постављању дијагнозе су били: појава и количина исцедка из носа, исцедак из ока, положај ушију, ректална температура, кашаљ (спонтани или индуковани), број респирација. За оцењивање стања респираторног система коришћен је респираторни скоринг систем сличан оном који је установио McGuirk [192]. Прегледом је код 23 телета дијагностификована блага форма бронхопнеумоније. Код 15 телића нису детектовани видљиви клинички знаци болести.

Анализа основних хематолошких параметара периферне крви телади урађена је на Факултету ветеринарске медицине у Београду коришћењем хематолошког анализатора (Hematology analyzer 901062, Diatron, Arcus, GmbH, Аустрија). Резултати су показали да између здраве и болесне телади није постојала разлика у броју еритроцита, леукоцита и тромбоцита, како ни у диференцијалном броју леукоцита периферне крви (табела 4.1).

Са циљем идентификовања микробиолошког узрочника бронхопнеумоније и давања одговарајуће терапије оболелим животињама је узиман дубоки носни брис. Такође, узимани су и брисеви носа клинички здравих животиња. Идентификација микроорганизама (бактерија и гљивица) је рађена на Катедри за микробиологију Факултета ветеринарске медицине у Београду, конвенционалним микробиолошким методама и коришћењем аутоматског идентификационог система BBL Crystal

Enteric/nonfermenter ID kit (Becton Dickinson). Из носних брисева болесне телади изолована је *Pasteurella multocida*. Друге патогене бактерије (укључујући и микоплазму) и гљивице нису нађене. Сви изолати *P. multocida* су припадали серотипу А. Серотип је одређен у Научном институту за Ветеринарство Србије из Београда. Присуство вирусних узрочника бронхопнеумоније није испитивано. Из назалних брисева здраве телади изолована је физиолошка микрофлора.

Табела 4.1. Основни хематолошки параметри периферне крви здраве телади и телади са бронхопнеумонијом[§].

	Здрава	Болесна
Еритроцити ($10^9/L$)	11 ± 1	11 ± 1
Хематокрит (%)	30 ± 3	33 ± 3
Хемоглобин (g/L)	92 ± 9	100 ± 10
Леукоцити ($10^9/L$)	9 ± 2	9 ± 1
Лимфоцити ($10^9/L$)	$5,6 \pm 1,0$	$6,2 \pm 1,0$
Моноцити ($10^9/L$)	$0,3 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,2$
Гранулоцити ($10^9/L$)	$2,9 \pm 1,4$	$2,3 \pm 0,6$
Лимфоцити (%)	65 ± 12	71 ± 7
Моноцити (%)	3 ± 3	2 ± 3
Гранулоцити (%)	32 ± 12	26 ± 6
Тромбоцити ($10^9/L$)	485 ± 122	562 ± 125

[§] Резултати су приказани као $\bar{x} \pm SD$

Након постављања дијагнозе и добијања резултата микробиолошке анализе, а пре почетка терапије антибиотцима, узимани су узорци периферне крви болесне телади. Такође, узимани су и узорци периферне крви здраве телади. Из узорака крви су изоловани крвни серуми (4.3.1) из којих су у следећем кораку изоловани СИС (4.3.2).

У део студије која је за циљ имала испитивање улоге СИС као модулатора функције леукоцита периферне крви било је укључено 10 здравих телића који нису били укључени у први део студије. Од ове телади су узимани узорци периферне крви из којих су изоловани гранулоцити и моноклеарне ћелије. Они су служили као респондерске ћелије у *in vitro* тестовима којима је испитивана модулаторна улога СИС (4.3.11).

4.2 Списак главне коришћене опреме

Аналитичка вага AE200 Mettler (Mettler, Швајцарска);

pH метар MA 5740, (Искра, Југославија);

Центрифуга “Megafuge 1.0R” (Heraeus, Немачка);

Центрифуга Rotofix 32 (Hettich, Немачка);

Миницентрифуга Capsule HF_120, Tomy Seiko co., LTD. (Токио, Јапан);

Спектрофотометар “Ultrospec 3300 pro”, UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Шведска);

Читач микротитарских плоча Multiscan Plus reader (Labsystem, Финска);

Хоризонтално ротациона мешалица Yellow line OS 5 basic (Ika Werbe GmbH & Co, Немачка);

Мини апарат за вертикалну електрофорезу Hoeffer SE 260 Mini-Vertical Unit (Amersham Pharmacia Biotech, Шведска);

Апарат за хоризонталну електрофорезу Multifor II Electrophoresis sistem (LKB, Шведска);

Гасни хроматограф SHIMADZU (Kyoto, Јапан);

Ламинарна комора за стерилан рад (Laminar flow cabinet) AURA VF48 (Bio Air Instruments, Италија);

Инкубатор за култивацију ћелија B5060EK/CO2 (Heraeus, Немачка);

Директни микроскоп BK 1301 (Optika microscopes, Италија);

Инвертни микроскоп са фазним контрастом Olimpus CKX 41 (Olympus Europa Holding GmbH, Немачка);

Проточни цитометар CyFlow SL (Paratec, Немачка);

Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Велика Британија);

Аутоматски биохемијски анализатор COBAS INTEGRA 400 plus (Roche Diagnostics Limited, Швајцарска).

4.3 Методе

4.3.1 Изоловање крвног серума

Узорци крви оболеле и здраве телади су асептички прикупљени пункцијом југуларне вене. Крв је сакупљана у пластичне вакутејнере без антикоагуланса (BD Diagnostics, САД). Изоловање серума је рађено у ламинарној комори за стерилан рад. Крвни серум је након спонтане коагулације у трајању од 24h на 37°C, одливен у стерилну епрувету, а затим центрифугован 10 min, на 1257xg, на 22°C. Из запремине од 1 mL серума одмах по изоловању исталожени су СИС, а преостали серум је алоквотиран и чуван на -20°C до анализе.

4.3.2 Изоловање СИС преципитацијом полиетилен-гликолом (PEG)

СИС из серума телади су изоловани таложењем PEG-ом релативне молекулске масе 6000 [78].

Раствори:

100 mM боратни пуфер, pH 8,3-8,5

Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	3,81 g
дестилована вода	до 100 mL
pH на 8,3-8,5 подешен 1M HCl	

4,5 % (m/V) PEG

PEG (молекулска маса 6000)	4,5 g
100 mM боратни пуфер, pH 8,3-8,5	до 100 mL

Изотонични 10 mM фосфатни пуфер, pH 7,2-7,4 (енгл. *phosphate buffered saline*, PBS); **137 mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 2,7 mM**

КСИ

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,44 g
KCl	0,20 g
H ₂ O	до 1L

Поступак: Поступак изоловања СИС је рађен у ламинарној комори за стерилан рад. Сви раствори су стерилисани филтрацијом кроз филтере са порама величине 0,2 μm . СИС су исталожени додавањем 3 mL 4,5% PEG-а у 1 mL свежег (незамрзаваног) серума. Раствор је инкубиран два сата на температури од 4°C а затим центрифугиран 20 min на 1250xg, на 4°C. Супернатант је одливен а вишак течности из епрувете са талогом је уклоњен капиларно филтер папиром. Талог је ресуспендован у 1 mL PBS-а. Ниво СИС одређиван је мерењем апсорбације ресуспендованог PEG талоба на 350 nm (A_{350}). Након мерења A_{350} узорци су аликвотирани и до анализе чувани на -20°C.

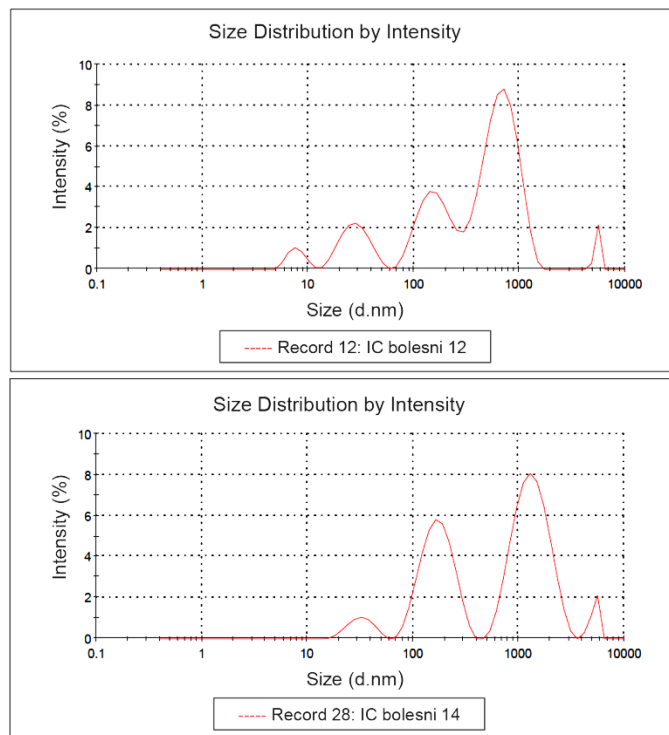
4.3.3 Одређивање величине конституената и зета потенцијала СИС

Просечна величина честица (хидродинамички просечан пречник, енгл. *intesity-weighted mean diameter, z-average*) неразблажене суспензије имунокомплекса, мерена је применом технике динамичког расипања светлости (енгл. *Dynamic Light Scattering, DLS*, тзв. фотон корелациона спектроскопија, енгл. *Photon Correlation Spectroscopy, PCS*). Овом техником мери се степен флукуације интензитета расуте светлости ($\lambda=633\text{ nm}$, He-Ne ласер, угао расипања 173°) услед Брауновог кретања честица у узорку и преводи у величину честица помоћу *Stokes-Einstein*-ове једначине:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$

где је D- транслациони дифузиони коефицијент који је обрнуто пропорционалан динамичкој вискозности η и полупречнику r идеално сферне честице, k је Boltzmann-ова константа, а T апсолутна температура. У условима константне температуре, дифузиони коефицијент за сферичну честицу полупречника r зависи само од динамичке вискозности узорка [193].

Непосредно пре почетка мерења припремљени су збирни узорци (тзв. пулови; енгл. *pools*) СИС здраве и болесне телади. Мерење збирних узорака СИС здраве и болесне телади је изведено у полистиренским киветама за једнократну употребу, при чему је сваки узорак мерен 23 пута у петнаест понављања. Резултати су приказани као појединачне криве зависности процента укупне расуте светлости од величина честица (Слика 4.1).



Слика 4.1. Оригинални графички приказ резултата анализе молекулских конституената у збирним узорцима телади.

Исти уређај коришћен је и за одређивање зета потенцијала (елетрокинетичког потенцијала) честица имунокомплекса на основу њихове електрофоретске покретљивости, а применом једначине Smoluchowsk-ог:

$$\zeta = \mu\eta/\epsilon$$

где је ζ -зета потенцијал, μ -покретљивост, η -вискозност суспензије, а ϵ -диелектрична константа растварача. Мерење је вршено на 25°C у савијеној (енгл. *folded*) капиларној ћелији (DTS 1060) за једнократну употребу.

4.3.4 Изоловање IgG из крвног серума и СИС телета

4.3.4.1 Изоловање серумских IgG јоноизмењивачком хроматографијом

IgG из серума су изоловани хроматографијом на колони од анјонског измењивачког матрикса Q Sepharose Fast Flow (GE HealthCare LifeScience), по методи коју су описали [194].

Раствори:

1 M TRIS, pH 7,3

TRIS	60 g
Дестилована вода	до 400 mL
<i>pH подешен на 7,3 концентрованом HCl</i>	
Дестилована вода	до 500 mL

2M NaCl

NaCl	117 g
Дестилована вода	до 1 L

Пуфер за еквилибрацију јоноизмењивачког матрикса (стартни пуфер):

20 mM TRIS, pH 7,3

1M TRIS, pH 7,3	20 mL
Дестилована вода	до 1 L

Пуфер за елуцију I: 20 mM TRIS, pH 7,3+50 mM NaCl

1M TRIS, pH 7,3	10 mL
2M NaCl	12,5 mL
Дестилована вода	до 500 mL

Пуфер за елуцију II: 20 mM TRIS, pH 7,3+100 mM NaCl

1M TRIS, pH 7,3	10 mL
2M NaCl	25 mL
Дестилована вода	до 500 mL

Пуфер за елуцију III: 20 mM TRIS, pH 7,3+200 mM NaCl

1M TRIS, pH 7,3	10 mL
2M NaCl	50 mL
Дестилована вода	до 500 mL

Сви раствори и пуфери су стерилисани филтрацијом кроз филтере са порама пречника 0,2µm.

Поступак:

а) Припрема узорка серума за хроматографско фракционисање

Серум у запремини 0,5 mL је центрифугован 10 min, на 4000xg, на 4°C. Након центрифугирања супернатант је разблажен 20 mM TRIS-ом pH 7,3 до запремине од 5 mL, и стерилисан филтрацијом кроз филтере са порама пречника 0,2 µm.

б) Припрема хроматографске колоне

Хроматографско фракционисање протеина серума је рађено у стакленим колонома пречника 0,7 cm. У колоне је „паковано“ 2,5 mL анјонског хроматографског матрикса Q Sepharose Fast Flow који је еквилибрисан на собној температури, пропуштањем 50 mL стартног пуфера протоком од 5 mL/min.

в) Хроматографија

Узорак разблаженог серума је наношен на хроматографску колону протоком од 5 mL/min. Невезани материјал (протеини са високим вредностима pI) је са колоне уклоњен пропуштањем 10 mL стартног пуфера. Елуирање везаних протеина је рађено изократски пропуштањем пуфера са растућим концентрацијама NaCl: 1) 10 mL пуфера за елуцију I; 2) 10 mL пуфера за елуцију II; 3) 10 mL пуфера за елуцију III; и 4) 1 mL 2 M NaCl. Проток раствора је био 5 mL/min. По завршеној хроматографији колона је очишћена пропуштањем 1 M NaOH (1 mL) а затим регенерисана пропуштањем стартног пуфера све док pH вредност елуента није опала на 7,3. Концентрација протеина у фракцији серумских протеина који се нису везивали за хроматографски матрикс је била ниска (нижа од 0,2 mg/mL) и протеини ове фракције су концентровани ацетонском преципитацијом. По 1 mL протеинске суспензије помешан је са 4 mL ацетона охлађеног на -20°C, након чега је смеша остављена 18–20 h на 4°C. Након завршене преципитације протеини су исталожени центрифугирањем 10 min на 10000xg, на 4°C. Супернатант је одливан, талог осушен на ваздуху и ресуспендован у 100 µL PBS-а. Хроматографски раздвојене фракције су

аликвотиране и до анализе чуване на -20°C , а њихов протински састав је анализиран електрофорезом (4.3.6.2).

4.3.4.2 Изоловање IgG из крвног серума риванолском преципитацијом

IgG су из серума парцијално фракционисани риванолским поступком по методи коју је описао Sagan [195].

Раствори и реагенси:

1,5% риванол (етакридин лактат) у води

5 M NaCl

Активни угаљ

Поступак: У 0,25 mL запремине узорка серума у капима је додавано 0,25 mL 1,5% раствора риванола. Добијена смеша је снажно промешана и остављена преко ноћи на 4°C . Сутрадан је центрифугирана 10 min, на собној температури на 3000xg. Након центрифугирања покупњен је супернатант. Да би се уклонио риванол у супернатант је додат активни угаљ у концентрацији 0,25 mg/mL. Након мешања у трајању од 3 min, супернатант је остављен 1h на 4°C , а затим је риванол исталожен центрифугирањем (10 min, собна температура, 3000xg). Протеини из риванолског талога су солубилизовани додавањем 200 μL 5M NaCl. Протеинска смеша је центрифугирана 10 min, на собној температури на 3000xg, након чега је риванол остао у талогу. Супернатант са солубилизованим протеинима је ресуспендован у 5 mL дестиловане воде. Концентрација протеина у препарату риванол-преципитабилних протеина је била ниска и протеини су концентровани преципитацијом ацетоном (4.3.4.1).

Састав препарата риванол-непреципитабилних протеина (риванолски супернатанати) и риванол-преципитабилних протеина (риванолски талози) је анализиран електрофорезом (4.3.6.2).

4.3.4.3 Афинитетно изоловање IgG из серума, серумских фракција и СИС

Изоловање IgG из збирних узорака серума, СИС, риванол-солубилних и риванол-преципитабилних протеина серума и протеина серума изолованих јоноизмењивачком хроматографијом серумских фракција и СИС је рађено афинитетним везивањем за протеин G *Streptococcus sp.* или протеин A *Staphylococcus aureus*. Концентрација и количина IgG у овим узорцима одређена је дензитометријском анализом након SDS-PAGE у нередукујућим условима ,

Табела 4.2. IgG у збирним узорцима серума и СИС, риванол-преципитабилним и риванол-солубилним протеинима серума и протеинима серума изолованих ањонском хроматографијом.

збирни узорци		Протеини (mg/mL)	IgG† (%)	IgG† (mg/mL)	IgG§	
					µL	µg
серум	здрави	76	32	24	20	480
	болесни	79	30	24	20	480
СИС	здрави	2.2	44	1.0	120	120
	болесни	2.9	40	1.2	120	144
р.с.	здрави	3.7	51	1.9	120	228
	болесни	4.5	48	2.2	120	264
р.т.	здрави	1.1	21	0.2	200	40
	болесни	1.2	18	0.2	200	40
IEX	здрави	0.2	92	0.2	200	480
	болесни	0.2	90	0.2	200	480

Протеини: концентрација укупних протеина у нефракционисаним узорцима; р.с.: риванол-солубилни протеини; р.т.: риванол-преципитабилни протеини; IEX протеини изоловани јоноизмењивачком хроматографијом. IgG†: релативна и апсолутна концентрација IgG; IgG§ запремина и количина IgG који су раздвајани афинитетном хроматографијом.

Реагенси и раствори:

ДунаВeads протеин G (Thermo Fisher Scientific)

ДунаВeads протеин A (Thermo Fisher Scientific)

PBS

Редукујући пуфер за узорке за електрофорезу протеина у поликариламидном гелу са додатком натријум додецил сулфата (SDS-PAGE) (4.3.6.2)

Нередукујући пуфер за узорке за SDS-PAGE (4.3.6.2)

Поступак: Непосредно пре почетка афинитетног изоловања IgG серуми су шест пута разблажени PBS-ом. DynaBeads протеин G или протеин A куглице (40 μ L/узорку) су исталожене центрифугирањем (2 min; 3000xg) и испране два пута PBS-ом. По 40 μ L протеин G или протеин A куглица је додавано у узорке разблаженог серума, неразблажених СИС, риванол-преципитабилних протеина, риванол-непреципитабилних протеина серума или протеина серума изолованих јоноизмењивачком хроматографијом. Изоловање IgG из сваког узорка је рађено у дубликату. Инкубација и афинитетно везивање IgG је трајало 40 min на собној температури, уз непрекидно мешање на ротационој мешалици, брзином од 60xg. По истеку овог времена DynaBeads куглице са везаним IgG су исталожене центрифугирањем 2 min, на 3000xg, на 4°C, након чега је невезани материјал уклоњен четвороструким испирањем куглица PBS-ом. Након последњег испирања на талог је додато 100 μ L редукујућег или нередукујућег пуфера за узорке. Узорци у које је додат редукујући пуфер за узорке су кувани 5 min у кључалом воденом купатилу, нагло охлађени водом и центрифуговани 2 min на 3000xg. Узорци у које је додат нередукујући пуфер су остављени на собној температури 5 min и центрифуговани. Супернатанти су одвојени и аликвотирани у порције од по 20 μ L и чувани на -20°C до анализе.

4.3.5 Одређивање концентрације протеина у серумима, серумским фракцијама и СИС

Концентрација укупних протеина у серумима, серумским фракцијама и СИС одређена је ВСА есејем коришћењем „ВСА Protein Assay“ комплета (Sigma).

Реагенси и раствори:

ВСА реагенс А

2% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,95% NaHCO_3 , 1% бицинхолинска киселина, 0,16% $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ у 0,1 М NaOH

ВСА реагенс Б

4% раствор бакар-сулфата

Радни ВСА реагенс

Прави се непосредно пре употребе мешањем 50 запремина реагенса А и 1 запремина реагенса Б.

Раствори говеђег албумина (BSA) за стандардну праву

Раствори BSA у опсегу концентрација од 31 до 1 000 $\mu\text{g/mL}$ су прављени серијским двоструким разблаживањем 2% раствора BSA разблаживањем у 0,9% NaCl.

Поступак: Непосредно пре почетка рада 1) направљени су стандардни раствори BSA, 2) CIC два пута разблажени PBS-ом, 3) серуми 200 пута разблажени PBS-ом 4) риванолски супернатант 5) риванолски талози су два пута разблажени PBS-ом и 6) фракције протеина серума изоловане јоноизмењивачком хроматографијом. Тест је извођен у микротитарским плочама са 96 места са равним дном. У бунариће плоче је додавано по 25 μL стандардних раствора BSA, разблажених CIC, разблажених серума, риванолски супернатанти, разблажени риванолски талози и протеинске фракције након јоноизмењивачке хроматографије. Као слепа проба служио је PBS. Након додавања узорка, у сваки бунарић је додавано по 200 μL радног ВСА реагенса. Реакциона смеша је инкубирана 30 min на 37°C, а затим је мерена апсорбанција на 540 nm. На основу измерене A_{540} стандардних раствора коришћењем Excel програмског пакета конструисана је стандардна права зависности A_{540} од концентрације протеина и израчуната је једначина праве. На основу очитаних вредности A_{540} из једначине праве израчунате су концентрације протеина у свим узорцима.

4.3.6 Електрофоретске технике за анализу протеина крвног серума, серумских фракција и СИС

4.3.6.1 Електрофореза протеина у гелу агарозе

Протеини серума и СИС су анализирани електрофорезом у гелу 1% агарозе изведеном по методи коју је описао Johansson [196].

Раствори:

Пуфер за електрофорезу: 92 mM веронални пуфер, рН 8,6

Na-веронал	17 g
Дестилована вода	0,8 L
<i>1M HCl</i>	<i>подесити рН на 8,6</i>
Дестилована вода	до 1 L

Раствор за фиксирање/обезбојавање гелова:

45% метанол, 10% сирћетна киселина

Метанол	450 mL
Сирћетна киселина	100 mL
Дестилована вода	до 1 L

Раствор за бојење гелова:

0,12% *Coomassie Brilliant Blue R* раствору за обезбојавање

<i>Coomassie Brilliant Blue R</i>	1,2 g
Раствор за обезбојавање	до 1 L

Поступак: Електрофореза је рађена у гелу 1% агарозе, дебљине 1 mm који је формиран наношењем вреле, растопљене, агарозе на стаклене плоче, након чега је агароза остављана на ваздуху 10-15 минута, а затим је преношена у влажну комору 24 сата, до потпуне полимеризације. У полимеризован гел су филтер папиром дебљине 1 mm усецани резервоари ширине 0,7 cm у које је наношено 3 μ l серума или 6 μ l СИС. Плоче са агарозом су смештене у апарат за хоризонталну електрофорезу напуњен вероналним пуфером, и изложене дејству електричног поља јачине 8 mA по узорку у трајању од 40 min. По завршеном електрофоретском раздвајању, гелови су

фиксирани 1h, осушени на температури од 60-70°C, потопљени у боју 15 min, обезбојени уз неколико измена раствора за фиксирање/обезбојавање до потпуног уклањања вишка боје, и осушени на ваздуху. Релативни удео (%) електрофоретских фракција одређиван је дензитометријском анализом електрофореграма коришћењем Image Master TotalLab softvera (GE HealthCare LifeScience).

4.3.6.2 Електрофореза протеина у полиакриламидном гелу са додатком натријум додецил сулфата (енгл. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE)

SDS-PAGE у редукујућим и нередукујућим условима по методи коју је описао Laemmli [197] анализирани су 1) нефракционисани серуми и СИС, 2) IgG изоловани из крвног серума риванолском преципитацијом, 3) IgG изоловани из крвног серума јоноизмењивачком хроматографијом и 4) IgG крвног серума и СИС афинитивно изоловани на протеину G или протеину А. Раздвојене протеинске фракције су визуелизоване бојењем гелова *Coomassie Brilliant Blue*, сребром, *Shiff*- им реагенсом и *Stain all* реагенсом.

4.3.6.2.1 Електрофоретско раздвајање

Раствори:

Раствор мономера акриламида (AA)

Комерцијални раствор 30% Т, 2,7% С, (Serva)

4x концентрован пуфер за раздвајање: 1,5 М TRIS, рН 8,8

TRIS 36,3 g

Дестилована вода до 200 mL

рН на 8,8 подешен концентрованом HCl

4x концентрован пуфер за узорковање: 0,5 М TRIS, рН 6,8

TRIS 3,0 g

Дестилована вода до 50 mL

рН на 6,8 подешен концентрованом HCl

10 % (m/V) SDS

SDS 10 g
Дестилована вода до 100 mL

10% (m/V) APS

Амонијум персулфат 0,1 g
Дестилована вода до 1 mL
Прави се непосредно пре употребе.

Раствор за покривање гела за раздвајање: 0,375 M TRIS, 0,1% SDS, pH 8,8

4x концентрован пуфер за раздвајање 25 mL
10% SDS 1,0 mL
Дестилована вода до 100 mL

Два пута концентрован редукујући пуфер за узорке: 0,125 M TRIS, 4% SDS, 20% глицерол, 0,2 M DTT, 0,02 % бромфенол плаво, pH 6,8

4x концентрован пуфер за раздвајање 2,5 mL
10% SDS 4,0 mL
Глицерол 2,0 mL
Бромфенол плаво 2,0 mg
DTT 0,31 mg
Дестилована вода до 10 mL

Два пута концентрован нередукујући пуфер за узорке: 0,125 M TRIS, 4% SDS, 20% глицерол, 0,02 % бромфенол плаво, pH 6,8

4x концентрован пуфер за раздвајање 2,5 mL
10% SDS 4,0 mL
Глицерол 2,0 mL
Бромфенол плаво 2,0 mg
Дестилована вода до 10 mL

Пет пута концентрован редукујући пуфер за узорке: 0,25 M TRIS, 10% SDS, 30% глицерол, 0,02 % бромфенол плаво, pH 6,8

1 M TRIS pH 6,8 5,0 mL
10% SDS 2,0 g
Глицерол 5,6 mL
1% Бромфенол плаво 400 µL
Дестилована вода до 19 mL

10x концентрован пуфер за резервоар: 0,25 М TRIS, 1,92 М глицин, 1% SDS, рН 8,3

TRIS	15,15 g
Глицин	72,08 mL
10% SDS	50 mL
Дестилована вода	до 500 mL

Припрема гелова:

	Запремина раствора (mL)			
	6% гел за раздвајање	8% гел за раздвајање	12% гел за раздвајање	4% гел за концентрирање
AA	2,0	2,7	4,0	1,0
1,5 М TRIS, рН 8,8	2,5	2,5	2,5	/
0,5 М TRIS, рН 8,8	/	/	/	0,75
H ₂ O	5,3	4,6	3,3	4,1
10% SDS	0,1	0,1	0,1	0,06
TMED	0,008	0,006	0,004	0,006
10% APS	0,1	0,1	0,1	0,06

Поступак: Електрофореза је рађена у 12% гелу за раздвајање (SDS-PAGE у редукујућим условима) или 8% гелу за раздвајање (SDS-PAGE у нередукујућим условима) и 4% гелу за концентрирање дебљине 1 mm.

Узорци за раздвајање нередукујућом SDS-PAGE су припремани тако што је запремина узорка која садржи 10 µg протеина (бојење СВВ и сребром) или 30 µg (за бојење *Shiff*-овим реагенсом или Stain all реагенсом) помешана са једнаком запремином редукујућег пуфера за узорке и након 5 min стајања на собној температури наносена на гел. Узорци за раздвајање редукујућом SDS-PAGE (бојење СВВ и сребром) су кувани 5 min, а затим охлађени чесменском водом.

Узорци су на гел наносени уз помоћ чешља са 10 места. На сваки гел, осим узорака, наносени су маркери стандардних молекулских маса. Коришћено је више маркера компаније Thermo Fisher Scientific. Молекулске масе протеинских стандарда

су дате уз слике електрофореграма у поглављу Наши радови. Електрофореза је извођена при константној јачини струје од 15 mA по гелу, уз непрестано хлађење.

4.3.6.2.2 Визуелизација протеинских фракција

Бојење гелова *Coomassie Brilliant Blue R 250* (CBV R 250)

Раствори:

Раствор боје: 0,025% CBV R 250, 40% метанол, 7% сирћетна киселина

CBV R 250	0,50 g
Метанол	800 mL
Сирћетна киселина	140 mL
Дестилована вода	до 2 L

Раствор за обезбојавање I: 40% метанол, 7% сирћетна киселина

Метанол	400 mL
Сирћетна киселина	70 mL
Дестилована вода	до 1 L

Раствор за обезбојавање II: 5% метанол, 7% сирћетна киселина

Метанол	50 mL
Сирћетна киселина	70 mL
Дестилована вода	до 1 L

Раствор за чување гелова: 7% сирћетна киселина

Сирћетна киселина	70 mL
Дестилована вода	до 1 L

Поступак: Након завршене SDS-PAGE гел је остављен у раствору боје преко ноћи. Вишак боје уклоњен испирањем у раствору за обезбојавање I у трајању од 30 min и двоструким испирањем у раствору за обезбојавање II у трајању 60 min.

Бојење гелова сребром

Раствори:

Раствор за фиксирање: 50% метанол, 12 % сирћетна киселина, 0,05% формалдехид

Метанол	125 mL
Сирћетна киселина	30 mL
Дестилована вода	95 mL

Раствор се чува на собној температури.

Непосредно пре употребе додати 125 μ l 35% формалдехида.

Раствор за испирање: 20% етанол

Етанол 96%	50 mL
Дестилована вода	до 200 mL

Активатор: 0,02% Na₂S₂O₃

Na ₂ S ₂ O ₃	0,05g
Дестилована вода	до 250 mL

Раствор сребра: 0,2% AgNO₃/0,076% формалдехид

Раствор се прави свеж

AgNO ₃	0,50 g
Дестилована вода (охлађена)	до 250 mL

Раствор треба да стоји на 4°C, а непосредно пре употребе додаје се 200 μ l 35% формалдехида.

Развијач: 6% Na₂CO₃; 0,0004% Na₂S₂O₃; 0,05% формалдехид

Na ₂ CO ₃ (анхидрован)	15,0 g
0,02% Na ₂ S ₂ O ₃	5,0 mL
Дестилована вода	до 250 mL

Непосредно пре употребе додаје се 140 μ l 35% формалдехида

Раствор за заустављање развијања: 12% сирћетна киселина

Сирћетна киселина	30 mL
Дестилована вода	до 250 mL

Поступак: Након завршене електрофорезе гел је фиксиран 2h, испран у 20% етанолу (3 x 10min), потопљен у 2 min у Na₂S₂O₃ и испран дестилованом водом (2 x 1min). Гел

је 20 min држан у раствору сребра, испран дестилованом водом (2 x 1min), кратко испран раствором за развијање и пренет у свеж раствор за развијање до појаве трака одговарајућег интензитета, а затим је даље развијање заустављено додавањем раствора за прекидање развијања.

Бојење протеина *Stain all* реагенсом

Раствори:

Раствор за фиксирање: 40% метанол и 10% сирћетна киселина

Метанол	100 mL
Сирћетна киселина	25 mL
Дестилована вода	до 250 mL

Шток раствор боје: Stains all (Sigma Aldrich, E9379)

Stains all	0,1 g
Формаид	100 mL

Боју мешати на магнетној мешалици 3-4 сата и чувати на собној температури у мраку.

Радни раствор боје:

Шток раствор боје	5 mL
Формаид	45 mL
Дестилована вода	50 mL

Поступак: Након завршене нередукуюће SDS-PAGE 8% гел је испиран и 1h фиксиран у раствору 40% метанола и 7% сирћетне киселине. По завршеној фиксацији гел је пренет у шток раствор боје и гел је у њему инкубиран 2h, а након тога пренет у радни раствор боје у коме је остављен преко ноћи на собној температури уз константно мешање. Сутрадан је гел испиран константним протоком чесминске воде до појаве трака.

Бојење гликопротеина *Shiff*- овим реагенсом

Раствори:

Раствор за фиксирање: 40% метанол и 7% сирћетна киселина

Метанол	100 mL
Сирћетна киселина	17,5 mL
Дестилована вода	до 250 mL

7% сирћетна киселина

Сирћетна киселина	35 mL
Дестилована вода	до 500 mL

Раствор за оксидацију: 1% перјодна киселина

Перјодна киселина	1,0 g
7% сирћетна киселина	100 mL

0,1 M AgNO₃

AgNO ₃	0,85 g
Дестилована вода	до 50 mL

0,1 M HCl

HCl концентрована	800 µL
Дестилована вода	до 100 mL

Раствор за редукцију: 1% метабисулфит

Метабисулфит	1 g
0,1 M HCl	до 100 mL

Припрема се свеж на дан употребе.

***Shiff*- ов реагенс: Schiff's reagent (Sigma Aldrich, 3952016-500ml)**

Поступак: Након завршене нередукујуће SDS-PAGE 8% гел је испиран и фиксиран у раствору 40% метанола и 7% сирћетне киселине прво 16h, а затим још 8 сати. Након завршене фиксације гел је кратко испран у дестилованој води (20-30 сек) а затим је додат у раствор за оксидацију у коме је стајао 60 min на собној температури. Гел је затим пренет у 7% сирћетну киселину у којој је стајао преко ноћи. Сутрадан је гел прво испран 2 пута по 10 min у по 200 mL дестиловане воде. Раствор који је остао након другог испирања је сачуван, а гел је пренет у нову посуду са дестилованом

водом. У раствор који је одливен додато је пар капи 0,1 М AgNO₃. Како није дошло до појаве преципитата гел је испран само још једанпут у дестилованој води и затим бојен *Shiff*- овим реагенсом, 2h, у мраку на 4°C. Након 2h реагенс је одливен и додато је 50 mL раствора за редукцију 10 min, а поступак је поновљен три пута. По завршеној редукцији гел је испиран чесменском водом до појаве трака.

4.3.6.2.3 Анализа обојених гелова

Обојени гелови су скенирани. Интензитет електрофоретских фракција и њихове молекулске масе (одређиване на основу дужине путовања маркера стандардних молекулских маса) су квантификоване дензитометријски, коришћењем програмског пакета Image Master Total Lab (GE HealthCare).

4.3.7 Електрофоретске технике за анализу липопротеина крвног серума и СИС

4.3.7.1 Анализа липопротеина електрофорезом у гелу агарозе

За анализу липопротеина серума коришћен је комерцијални пакет *SAS-MX Lipoprotein kit* (Helena BioSciences Europe, Велика Британија). Липопротеини серума раздвојени су електрофорезом у гелу агарозе са додатком 1% говеђег албумина, визуелизовани су са бојом Fat Red 7B, и квантификовани дензитометријом. Поступак је изведен по упутству произвођача.

4.3.7.2 Анализа липопротеина у нативном полиакриламидном гелу

Раствори:

Гел за раздвајање 8%

Akrilamid-Bis раствор (37,5:1), 30% m/V (Serva)	8,0 mL
1 М TRIS, pH 8,8	3,75 mL
Дестилована вода	16,75 mL
APS	500 µL
TMED	30 µL

Гел за концентровање

Акриламид-Вис раствор (37,5:1), 30% m/V (Serva)	500 μ L
1 М TRIS, рН 6,8	1,25 mL
Дестилована вода	2,8 mL
APS	100 μ L
TMED	10 μ L

Пуфер за резервоар

TRIS	1,515 g
Глицин	7,20 g
Дестилована вода	до 500 mL

Раствор боје Sudan црна В (BioBasic Inc., S0593)

Sudan Black B	500 mg
Ацетон	20 mL
Сирћетна киселина	15 mL
Дестилована вода	85 mL

Припремљени раствор боје мешати 30 минута док се боја не раствори. Након тога боју процедити кроз филтер папир у чисту стаклену посуду и заштити од светлости.

Раствор за обезбојавање

Сирћетна киселина	75 mL
Ацетон	100 mL
Дестилована вода	325 mL

Пуфер за узорке крвног серума

1 М TRIS, рН 6,8	0,5 mL
Глицерол	1,0 mL
Бром-фенол плаво	0,5 mL
Дестилована вода	2,0 mL

Пуфер за узорке СИС

1 М TRIS, рН 6,8	1 mL
Глицерол	2,0 mL
Бром-фенол плаво	0,5 mL
Дестилована вода	0,5 mL

Поступак: У 10 μL серума додавано је 40 μL пуфера за узорке серума, а по 10 μL овако припремљеног узорка наносено је у бунариће гела. У 30 μL СИС додано је 10 μL пуфера за узорке СИС, а у бунариће је наносено по 30 μL овако припремљеног узорка. Урађена је електрофореза у 8% полиакриламидном гелу у апарату и под условима описаним у 4.3.6.2.1. Након завршене електрофорезе, гел је пренесен у стаклену петри-шољу и преливен је са 100 mL раствора боје Sudan црне. Гел је остављен преко ноћи на собној температури, у петри-шољи прекривен алуминијумском фолијом. Сутрадан је боја одливена и додат је раствор за обезбојавање уз три промене. Након одбојавања гела и појаве црних трака гел је скениран и анализиран дензитометријски.

4.3.8 Методе за анализу липида крвног серума и СИС

4.3.8.1 Одређивање концентрације неутралних липида крвног серума

Концентрације триглицерида, укупног холестерола и холестерола у саставу HDL (mmol/l) одређене су на аутоматском анализатору. Концентрација холестерола у саставу LDL израчуната је према формули $\text{LDL} = \text{TC} - \text{HDL} - \text{TG}/2.2$ (mmol/l) [198].

4.3.8.2 Раздвајање и идентификовање липида крвног серума хроматографијом на танком слоју силика гела

(енгл. *Thin-layer chromatography; TLC*)

4.3.8.2.1 Екстракција укупних липида

У 0,5 mL серума или СИС додато је 4,5 mL смеше органских растварача хлороформ-метанол 2:1 (v/v). Смеша је вортексована до појаве емулзије и остављена 3h на +4°C. Након тога емулзија је центрифугована 15 min, на 2500xg, одвојен је доњи липидни слој у нову епрувету и остављен преко ноћи на -20°C. Сутрадан је поновљено центрифуговање и липидни екстракт у супернатанту је пропуштен кроз диск натријум сулфата и упарен до сува. Суви пречишћени екстракт је растворен у

0,3 mL смеше хлороформ-метанол 2:1 (v/v) и коришћен за хроматографско раздвајање липидних класа.

4.3.8.2.2 Раздвајање класа неутралних липида

Неутрални липиди раздвојени су једнодимензионом TLC на силика гелу 60 GF 254 (Sigma Aldrich, Немачка). За припрему силика гела помешано је 70 g силика гел 60 GF 254 и 158 mL дестиловане воде, смеша је снажно промешана и гел је развучен на плоче димензија 20x20 cm, дебљине 0,5 mm. Плоче су сушене 24h на собној температури. Пре почетка рада плоче су активирани 45 min на 110 °C.

Укупни липидни екстракт серума и СИС у запремини 0,3 mL је наношен на активiranу плочу. Као систем за раздвајање коришћена је смеша растварача петролетар-диетилетар-сирћетна киселина (87:12:1, v/v/v). Након 45 min, раздвојене фракције липида идентификоване су бојењем у јоду, и након једног дана скениране.

4.3.8.2.3 Раздвајање класа фосфолипида

Фосфолипиди су раздвојени једнодимензионом TLC на силика гелу 60 GF 254 (Sigma Aldrich, Немачка). Гел је припремљен на начин описан у 4.3.8.2.2.

Укупни липидни екстракт серума и СИС у запремини од 0,3 mL је наношен на плочу. Као систем за раздвајање коришћена је смеша растварача хлороформ-метанол-вода (25:10:1, v/v/v). Након 45 min, раздвојене фракције липида идентификоване су бојењем у јоду, и након једног дана скениране.

4.3.8.3 Анализа маснокиселинског профила фосфолипида серума и СИС гасно-течном хроматографијом

4.3.8.3.1 Екстракција укупних липида и раздвајање класа неутралних липида

Екстракција укупних липида је рађена на начин описан 4.3.8.2.1 с том разликом што је смеша органских растварача хлороформ:метанол 2:1 у 100 mL садржала 50 mg бутилхидрокси толуена. Липидне фракције су раздвојене TLC на начин описан у делу 4.3.8.2.2, а положај фракције фосфолипида детектован на основу аутофлуоресценце побуђене осветљавањем гела UV лампом.

4.3.8.3.2 Метилација масних киселина

Масне киселине су директно естерификоване по модификованој методи трансестерификације [199]. Фракција фосфолипида серума пренета је у епрувете за метилацију, екстракцијом са одговарајућег слоја силика гела са 1,5 mL хексана. Процес естерификације почео је додатком 0,2 mL 2M NaOH у метанолу и термостатирањем на 85°C 1h, а настављен додатком 0,2 mL 1M H₂SO₄ у метанолу и термостатирањем 2h на 85°C. После метилације охлађене епрувете су центрифугиране на 1860xg, 15 min, и хексански слој упарен до сува у струји азота.

4.3.8.3.3 Анализа масних киселина гасно-течном хроматографијом

Масне киселине су анализиране гасно-течном хроматографијом. Коришћена је капиларна колона Rtx 2330, RESTEK, САД, димензија 60x0,25 mm ID. Дебљина филма стационарне фазе је 0,20 µm. Проток носећег гаса хелијума био је 5 mL/min, проток ваздуха 320 mL/min, а водоника 30 mL/min. Температура детектора била је 240°C а инјектора 220°C. Температура колоне са 140°C колика је била на старту, подизана је до 190°C, брзином 3°C/min, а затим до 210°C брзином од 1°C/min. Узорци припремљених метил-естара растворени су непосредно пре инјектовања у 20 µL хексана, а од тога је инјектован 1 µL. Масне киселине су идентификоване упоређивањем са хроматограмом стандарда полинезасићених масних киселина

(PUFA-2 standard, Supelco, Inc., Belleforte, Pa., САД). Резултати су изражени у процентима од укупно раздвојених масних киселина.

4.3.9 Одређивање укупног антиоксидативног статуса крвног серума

Укупни антиоксидативи статус одређен је спектрофотометријски FRAP тестом (енгл. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP) [200] и ABTS тестом [201].

4.3.9.1 FRAP тест

Метода је заснована на способности антиоксиданаса, као електродонора, да при ниским вредностима рН редукују Fe^{3+} из комплекса фери-трипиридил триазина (гвожђе-2,4,6-трипиридил-s-триазин) до Fe^{2+} при чему се формира плаво обојени комплекс фери-трипиридил триазина са максимумом.

Раствори и реагенси:

23 mM ацетатни пуфер, рН 3,6

Na-ацетат x 3H ₂ O	3,10 g
Глацијална сирћетна киселина	16 mL
Дестилована вода	900 mL

Подесити рН на 3,6 1M NaOH или сирћетном киселином

Дестилована вода	до 1L
------------------	-------

40 mM HCl

Концентрована HCl	1,46 mL
Дестилована вода	до 1L

10 mM TPTZ (2,4,6-три[2-пиридил]-s-триазин)

Прави се на дан извођења теста

TPTZ	0,031g
40 mM HCl	10 mL

Растворити у воденом купатилу загрејаном на 50°C

20 mM FeCl₃·6H₂O

Прави се на дан извођења теста

FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,054 g
Дестилована вода	10 mL

Стандардни раствори FeSO₄·H₂O

Основни раствор: 1mM FeSO₄·7H₂O

FeSO ₄ ·H ₂ O	0,278 g
Дестилована вода	до 1 L

Од 1 mM FeSO₄·H₂O прави се серија стандардних раствора FeSO₄·H₂O концентрације 0,1-1,0 mM.

FRAP реагенс

Ацетатни пуфер	50 mL
TPTZ раствор	5 mL
20 mM FeCl ₃	5 mL
Дестилована вода	6 mL

Раствор се прави на дан извођења теста, и држи се у пластичној боци у воденом купатилу на 37°C.

Поступак: По 100 µL FeSO₄·7H₂O стандарда или узорака серума (2 пута разблажених у 0,9% NaCl) је помешано са 300 µL дестиловане воде а затим је додато 3 mL FRAP реагенса и инкубирано 6 min, на 37°C. Као слепа проба служила је дестилована вода (400 µL) којој је додавано 3 mL FRAP реагенса и такође инкубирано 6 min, на 37°C. Апсорбанција на 593 nm (A₅₉₃) продукта реакције измерена је на спектрофотометру. На основу прочитаних A₅₉₃ вредности стандарда конструисана је стандардна права зависности A₅₉₃ од концентрације FeSO₄·7H₂O. На основу прочитаних вредности A₅₉₃ узорака серума и стандардне праве одређен је антиоксидативни капацитет изражен као концентрација антиоксиданата која има способност редукције Fe³⁺ јона као и 1 mM раствор FeSO₄.

4.3.9.2 ABTS тест

Метода се заснива на „гашењу” тј. губитку боје плаво-зеленог радикал-катјона 2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине) (ABTS радикал-катјона), у присуству антиоксиданса.

Раствори и реагенси:

ABTS реагенс

ABTS	0,01920 g
Дестилована вода	5 mL

Раствор калијум-пероксисулфата

Калијум-пероксисулфата	0,37845 g
Дестилована вода	10 mL

ABTS радикал

ABTS реагенс	5 mL
Раствор калијум-пероксисулфата	88 μ l

Раствор треба умотати у алуминијумску фолију и оставити најмање 16 h на собној температури. На дан извођења теста раствор треба разблажити етанолом тако да се вредност апсорбације на 734 nm (A_{734}) износи 0,680-0,720 што одговара концентрацији ABTS радикала од приближно 1%.

Стандардни раствори 6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилне киселине (Trolox, аналог витамина E)

Основни раствор: 1 mM Trolox

Trolox	0,0125 g
Етанол	до 50 mL

Од 1 mM Trolox-а прави се серија стандардних раствора концентрација 0,2 -0,8 mM.

Поступак: Непосредно пре извођења теста узорци серума су 10 пута разблажени у 0,9% NaCl. По 20 μ l узорка серума или стандарда Trolox-а су додавани у 2 ml ABTS радикала и након 6 min стајања на собној температури A_{734} реакционог продукта је очитана на спектрофотометру. Као слепа проба служила је дестилована вода (20 μ L). На основу очитаних A_{734} вредности стандарда конструисана је стандардна права

зависности A_{734} од концентрације Trolox-а. Антиоксидативни капацитет узорака серума је одређен из стандардне криве на основу очитаних вредности A_{734} и изражен као mM еквивалента Troloxa.

4.3.10 Одређивање степена оксидативних оштећења липида и протеина крвног серума и СИС

4.3.10.1 Одређивање нивоа пероксидације липида серума и СИС

Степен липидне пероксидације је одређен спектрофотометријски на основу концентарције продуката липидне пероксидације (енгл. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, TBARS) у серумима методом Ohkawa и сар., [202]. Апсорбанција TBARS-а као маркера липидне пероксидације је мерена на 530 nm коришћењем 2-тобутиричне киселине (2,6-дихидроксипиримидин-2-тиол; *TBA*). За израчунавање је коришћен екстинциони коефицијент од 156000 mol^{-1} . Резултати су изражени као вредност TBARS у nmol.

4.3.10.2 Одређивање нивоа продуката унапредовале оксидације протеина серума и СИС

Ниво продуката унапредовале оксидације протеина (енгл. *Advanced oxidation protein products*, AOPP) је одређен спектрофотометријски мерењем апсорбанције реакционог продукта на 340 nm и експримиран као еквивалент хлорамина ($\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) [203].

4.3.11 Тестови за испитивање функционалних карактеристика леукоцита периферне крви

4.3.11.1 Реагенси за ћелијске културе и тестове

Основни RPMI-1640 медијум за ћелијске културе, са L-глутамином и 25 mM HEPESom, без NaHCO₃ (Sigma Aldrich, Немачка);

Раствор за изоловање МНС ($\rho=1,077 \text{ g/cm}^3$; PAA Laboratories, Аустрија);

Фетални телећи серум (енгл. *fetal bovine serum*- FBS; PAA Laboratories, Аустрија);

10 x концентрован PBS (PAA Laboratories, Аустрија);

200 mM глутамин (PAA Laboratories, Аустрија);

100 x концентрован раствор пеницилина и стрептомицина (10000 IU/mL пеницилина и 10 mg/mL стрептомицин растворен у 0,9% NaCl; PAA Laboratories, Аустрија);

Форбол миристат ацетат (енгл. *phorbol 12-myristate 13-acetate*- PMA; Sigma Aldrich, Немачка);

Кристал виолет ((трис-(4-диметиламино) фенил) метил- хлорид); Sigma Aldrich, Немачка);

Нитро плаво тетразолојум хлорид (енгл. *nitro blue tetrazolium chloride*, NBT; Merck, Немачка);

Фитохемаглутинин (енгл. *phytohemagglutinin*- PНА; ИНЕР-Институт за примену нуклеарне енергије, Србија);

МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид; CN Biomedicals, САД);

Пропидијум јодид (Beckman Coulter International SA, Швајцарска);

Комерцијални пакет за детекцију апототичних ћелија: *Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI, for flow cytometry* (Termo Fisher Scientific, САД)

CFSE (eBioscience, САД).

4.3.11.2 Припрема медијума, пуфера и раствора за ћелијске културе

Комплетан медијум за култивацију ћелија: RPMI медијум са 10% FBS (RPMI/FBS медијум)

Основни RPMI медијум	89 mL
100 x концентровани пеницилин/стрептомицин	1 mL
FBS	10 mL

PBS (137 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2,7 mM KCl)

NaCl	8 g
KH_2PO_4	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,44 g
KCl	0,2 g
Дестилована вода за ћелијске културе до	1L

Пуфер за лизу еритроцита

(155 mM NH_4Cl ; 0,1 mM Na_2EDTA ; 10 mM NaHCO_3 ; pH 7,2-7,4)

NH_4Cl	8,02 g
Na_2EDTA	0,04 g
NaHCO_3	1 g
Дестилована вода за ћелијске културе до	1L

0,5% (m/V) MTT

MTT	125 mg
PBS	до 25 mL

0,5% (m/V) NBT

NBT	125 mg
PBS	до 25 mL

10% SDS са 10 mM HCl

10% SDS	99 mL
1M HCl	1 mL

0,3% (m/V) кристал виолет

Кристал виолет	0,3 g
Метанол	до 100 mL

33% (V/V) Сирћетна киселина

Сирћетна киселина	33 mL
Дестилована вода	до 100 mL

PBS sa 0,1% triton x-100

10% triton x-100	1 mL
PBS	до 100 mL

50 µg/ml пропиридијум јодид – радни раствор

Пропиридијум јодид	500 µg
PBS-u sa 0,1% tritonom x-100	10 mL

CFSE радни раствор: 5 mM CFSE у DMSO**4.3.11.3 Изоловање MNC и гранулоцита периферне крви телади**

Пуна крв антисептички је узета са натријум цитратом као антикоагулансом и на амбијенталној температури пренета до лабораторија Института за медицинска истраживања где је у комори за стерилан рад помешана у односу 1+1 са PBS-ом. По 25 mL разблажене ћелијске суспензије је наносено на 15 mL раствор за издвајање MNC. Ћелије су раздвајане центрифугирањем у трајању од 30 min, на 400xg, на 22°C. По завршеном центрифугирању, горњи слој (плазма и тромбоцити) је сакупљен пипетом и одбачен, а MNC из интерфазног прстена су сакупљане чистом пипетом и ресуспендоване у PBS-у до 50 mL. Ћелије су исталожене центрифугирањем (10 min, 500xg), а затим су ради уклањања густинског раствора ресуспендоване у PBS-у (до 30 mL) и исталожене центрифугирањем. Поступак испирања је поновљен три пута након чега су ћелије ресуспендоване у 5 mL RPMI/FBS медијума за култивацију ћелија.

Гранулоцити су из пуне крви изоловани лизирањем еритроцита у талогу добијеном након изоловања MNC центрифугирањем пуне крви на густинском раствору. На ћелијски талог који садржи еритроците и гранулоците додавана је шест пута већа запремина пуфера за лизу еритроцита. Ћелијска суспензија је мешана извртањем епрувете у трајању од 5 min. Након центрифугирања (10 min на 500xg, на 22°C) пажљиво је одливен супернатант, а затим су ћелије исталожене. Поступак

уклањања остатака лизираних еритроцита центрифугирањем је поновљен још два пута након чега су ћелије ресуспендоване у 5 mL RPMI/FBS медијума за култивацију ћелија.

4.3.11.4 Тест адхезије MNC и гранулоцита периферне крви

Модулаторни утицај CIC на адхезију леукоцита периферне крви за пластику испитиван је тестом који су описали Vlaški и сар. [174]. MNC и гранулоцити периферне крви телади су ресуспендовани у RPMI/FBS медијуму у концентрацији од 5×10^6 ћелија/mL. По 100 μ L ове суспензије (5×10^5 ћелија) је постављано у бунариће микротитарских плоча са равним дном са 96 места и култивисано 1h на 37°C у инкубатору за ћелијске културе са 5% CO₂. Након 1h култивације у контролне културе MNC и гранулоцита је додавано по 10 μ L PBS-а. Као „позитивна“ контрола служиле су културе ћелија које су стимулисане PMA (50 ng/mL). У културама у којима смо испитивали модулаторни утицај CIC на ослобађања ROS додавано је по 10 μ L CIC. Културе са CIC, PMA или PBS-ом су додатно икубиране 30 min на 37°C. Адхерентне ћелије су испране два пута PBS-ом и фиксиране метанолом, 10 min на собној температури. Метанол је испран PBS-ом а адхерентне ћелије су бојене 0,3% кристал виолетом 10 min на собној температури. Након бојења бунарићи су испирани у текућој води и осушени на ваздуху. Исталожена боја је растварана у 33% сирћетној киселини која је додавана у запремини од 100 μ L по бунарчићу. Интензитет ослобођене боје која одражава број адхерентних ћелија, је одређиван мерењем A₅₄₀. Резултати су приказани као релативна промена у односу на ниво спонтане адхезије (културе са PBS-ом) којима је арбитарно додељена вредност од 100%.

4.3.11.5 Тест редукције NBT-а

NBT редукционим есејо [174] мерен је модулаторни ефекат CIC здраве и оболеле телади на синтезу ROS у MNC и гранулоцитима телади. Тест је изведен тако што је 100 μ L MNC и гранулоцита у концентрацији од 5×10^6 ћелија/mL додавано у

бунариће микротитрационе плоче са равним дном од 96 места. Након додавања ћелија, у узорке у којима је мерен ниво спонтаног ослобађања ROS додавано је по 10 μL PBS-а. Као позитивна контрола служиле су ћелије које су стимулисане PMA (50 ng/mL). У културама у којима је испитиван утицај CIC на ослобађања ROS додавано је по 10 μL CIC. Културе су постављане у трипликатима. Ћелије су инкубиране 5 min у инкубатору за ћелијске културе на 37°C у 5% CO_2 , а затим је у сваки бунарић додато 10 μL раствора NBT. За 4h инкубације NBT је, под утицајем мембранске NADPH оксидазе редукован у нерастворни формазан, након чега је у културе додавано 100 μL 10% SDS-а са 10 mM HCl. Културе су остављене преко ноћи у инкубатору за ћелијске културе да би се растворио преципитирани формазин. Сутрадан је мерена апсорбанција на 540 nm раствореног формазина. Резултати су приказани као релативна промена у односу на спонтано ослобађање ROS (културе са PBS-ом) којима је додељена вредност од 100%.

4.3.11.6 МТТ тест

МТТ тестом је испитивана модулаторна улога CIC на преживљавање нестимулисаних MNC и гранулоцита у 24h и 48h културама и РНА стимулисаних MNC у 72h културама. MNC су ресуспендоване у RPMI/FBS медијуму за култивацију ћелија у концентрацији од 5×10^6 ћелија/mL. По 100 μL ове ћелијске суспензије је додавано у бунариће плоче са 96 места. Утицај CIC на модулацију вијабилности нестимулисаних MNC и гранулоцита одређен је тако што су ћелијама култивисаним само у RPMI/10% FBS додани CIC (10 μL по бунарићу), а као контролне културе су служиле ћелије којима је уместо CIC додавано 10 μL PBS-а. Утицај CIC на модулацију РНА стимулисане пролиферације MNC мерен је тако што су ћелијама које су стимулисане додавањем 2,5 $\mu\text{g/mL}$ РНА истовремено додани CIC (10 μL по бунарићу), а као контролне културе су служиле ћелије којима је уместо CIC додавано 10 μL PBS-а. Културе су постављане у трипликатима. Ћелије су култивисане 72h у инкубатору за ћелијске културе на 37°C у 5% CO_2 . Након култивације у бунариће је додавано по 10 μL раствора МТТ и инкубиран 3h на 37°C . За то време МТТ се конвертовао под утицајем митохондријских дехидрогеназа у нерастворан љубичасто

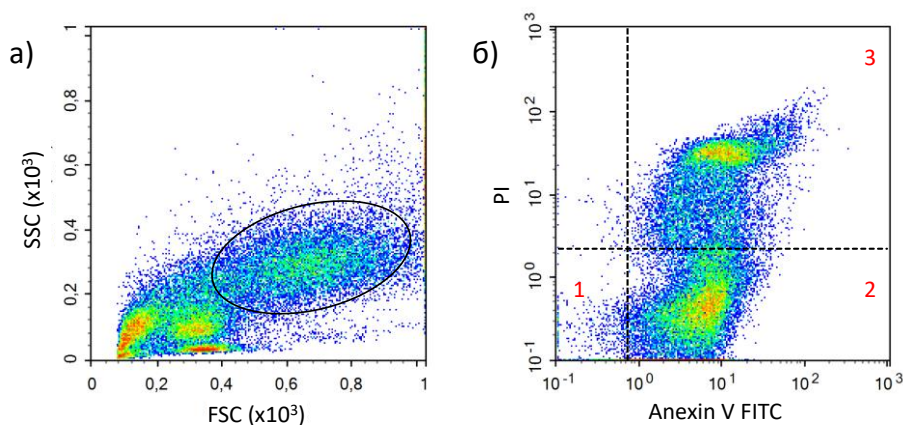
обојен формазан. Формазан је солубилизован додавањем 100 μL 10% раствора SDS-а са 10 mM HCl и инкубацијом на 37°C у трајању од 16 сати. Апсорбација на 540 nm раствореног формазана је мерана на читачу микротитарских плоча. Број ћелија у бунарићима је процењиван на основу измерене апсорбације, при чему су апсорбанце нестимулисаних MNC и гранулоцита или MNC стимулираних са РНА али култивисаних без присуства СИС, означене као контролне.

4.3.11.7 Методе проточне цитофлуориметрије

4.3.11.7.1 Анализа апоптозе бојењем ћелија Annexin V-FITC-ом и пропидијум јодидом

За процену утицаја СИС на апоптозу/некрозу и ћелијски циклус гранулоцита и нестимулисаних MNC и MNC стимулираних РНА (2,5 $\mu\text{g/mL}$) рађено је двоструко бојење Annexin V-FITC-ом (зелена флуоресценца) и PI (црвена флуоресценца). Ћелије су култивисане 24h или 48h у концентрацији од 5×10^5 ћелија/500 μl /бунарићу у плочама са 24 места. У културама у којима је испитиван ефекат СИС додавано је 50 μL СИС/бунарићу. По завршеној култивацији 2×10^5 ћелија из сваке културе је исталожено, ресуспендовано у PBS и поново исталожено. Након два циклуса испирања ћелије су ресуспендоване у 100 μL пуфера за везивање Annexin-a V (10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4) 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂), а затим је у суспензију додато 10 μl Annexin V-FITC и 5 μl PI. Ћелије су инкубиране у мраку, 15 min на температури од 25°C. После овог периода у суспензије је додато још по 400 μl пуфера за везивање Annexin-a V. У току наредних 60 min ћелије су анализиране на проточном цитометру. Популације ћелија су раздвојене на основу својих морфолошких катрактеристика: величине и гранулираности које су дефинисане на основу интензитета расипања светлости у под углом мањим од 10° (енгл. *forward light scatter*, FSC) и интензитета расипања светлости у под углом од 90° (енгл. *side light scatter*, SSC) (слика 4.2a), а затим је измерен ниво флуоресценце у анализираним популацијама. Ниво неспецифичне флуоресценце одређен је анализом необојених ћелија, ресуспендованих само у пуферу за везивање Annexin-a V. Резултати су приказани ако хистограми зависности интензитета зелене флуоресценце (Annexin V-FITC) и црвене

флуоресценце (PI). Ћелије су на основу интензитета флуоресценце означене као: 1) неапоптотичне, двоструко негативне ћелије; Annexin V-FITC⁻/PI⁻; 2) рано апоптотичне ћелије, реактивне само са Annexin V-; Annexin V-FITC⁺/PI⁻; 3) касно апоптотичне, двоструко позитивне ћелије; Annexin V-FITC⁺/PI⁺ (слика 4.2б). Резултати су изражени као проценат неапоптотичних и апоптотичних ћелија.

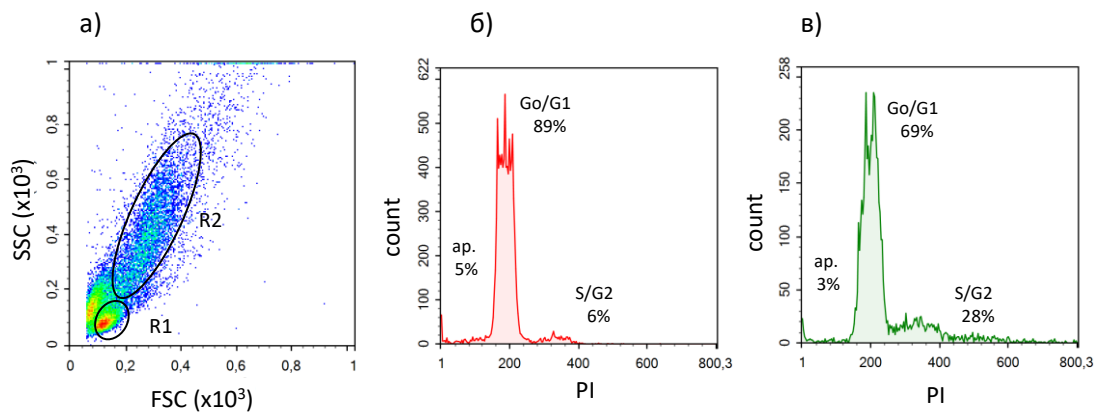


Слика 4.2. Графички приказ резултата анализе апоптотичних ћелија у културама гранулоцита периферне крви телета. а) Дијаграм расподеле ћелија по величини и унутрашњој гранулираности – FSC/SSC дијаграм. Означена је популација великих гранулираних ћелија. б) Приказ резултата двоструког обележавања ћелија Annexin V FITC-ом (зелена флуоресценца) и пропидијум јодидом (PI) (црвена флуоресценца). Вертикална линија означава граничну вредност нивоа неспецифичне црвене флуоресценце. Хоризонтална линија означава граничну вредност нивоа неспецифичне зелене флуоресценце. 1) вијабилне, неапоптотичне ћелије; 2) рано апоптотичне ћелије 3) касно апоптотичне/некротичне, ћелије.

4.3.11.7.2 Анализа ћелијског циклуса MNC бојењем пропидијум јодидом

За процену ефекта CIC на апоптозу/некрозу и ћелијски циклус нестимулисане MNC и MNC стимулисане PHA (2,5 µg/mL) су култивисане 72h у концентрацији од 5×10^5 ћелија/500 µl/бунарићу у плочама са 24 места. У културама у којима је испитиван ефекат CIC додавано је 50 µL CIC/бунарићу. У контролне културе додавано је 50 µL PBS. Након 72h у култури, по 2×10^5 ћелија из сваке културе су исталожене центрифугирањем, ресуспендоване у 1 mL PBS и фиксиране постепеним додавањем 2,5 mL апсолутног етанола уз благо мешање. Након инкубирања у раствору етанола у трајању од 10 min на леду, ћелије су исталожене

центрифугирањем, ресуспендоване у PBS, поново исталожене, ресуспендоване у 0,5 ml PBS са 0,1% triton x-100 и обојене додавањем 50 μ l раствора PI концентрације 50 μ g/mL (финална концентрација 5 μ g/mL). После 45 min стајања на 37°C ћелије су анализирани на проточном цитометру. Популације ћелије су прво раздвојене на основу величине и гранулираности (дефинисаних на основу FSC и SSC вредности) (слика 4.3а), а затим је измерен ниво флуоресценце у анализираним популацијама. Као контрола за одређивање нивоа неспецифичне флуоресценце служиле су необојене ћелије, ресуспендоване само PBS-у са 0,1% triton x-100. Резултати су приказани као хистрограм зависности броја ћелија од неспецифичне флуоресценце и проценат апоптотичних ћелија и ћелије у G0/G1, S и G2 фази ћелијског циклуса (слика 4.3б; 4.3в).

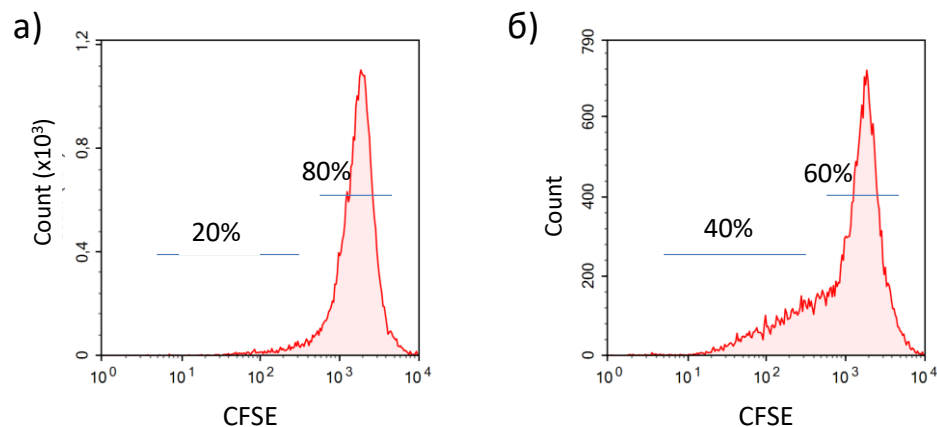


Слика 4.3. Графички приказ резултата анализе ћелијског циклуса у културама MNC периферне крви телета. а) Дијаграм расподеле ћелија по величини и унутрашњој гранулираности – FSC/SSC дијаграм. Означене су популација R1 (мале, негранулиране ћелије) и R2 (незнатно веће али доста гранулиране ћелије). б) Приказ процента апоптотичних ћелија (ар.) и ћелија у G0/G1 и S/G2 фази ћелијског циклуса у популацији R1. в) Приказ процента апоптотичних ћелија (ар.) и ћелија у G0/G1 и S/G2 фази ћелијског циклуса у популацији R2.

4.3.11.7.3 CFSE тест

Пролиферација MNC одређена је CFSE тестом. MNC ($2,5 \times 10^6$ /mL PBS који садрже 5% FBS) су пре почетка култивације обележене CFSE бојом у финалној концентрацији од 5 μ M. Обојене MNC, нестимулисане или стимулисане са РНА (2,5 μ g/mL) (5×10^5 ћелија/500 μ l/бунарићу; плоче са 24 бунарића), култивисане су са или

без 50 μl CIC. Културе нестимулисаних MNC култивисане без CIC су коришћене као контроле за испитивање ефекта CIC. За контролу методе коришћене су обојене MNC којима је пролиферација пре стављања у културу била заустављена инкубацијом са 25 $\mu\text{g/ml}$ митомицина C у трајању од 30 min на 37°C. После 6 дана у култури, ћелије су анализиране на проточном цитометру. Популације ћелије су прво раздвојене на основу величине и гранулираности а затим је измерен ниво флуоресценце у анализираним популацијама. У културама у којима су ћелије пролиферисале, ниво емитоване флуоресценце је био нижи (слика 4.4). Индекс пролиферације за сваки узорак је израчунат на основу формула коју су дали Parish и Warren [177] и употребом Microsoft Office Excel програмског пакета. Индекс пролиферације нестимулисаних MNC култивисаних у RPMI/FBS медијуму без додатка CIC је арбитарно означен као 1.



Слика 4.4. Графички приказ резултата анализе ћелијског циклуса у културама MNC периферне крви телета. а) Дијаграм зависности броја ћелија од интензитета флуоресценце CFSE у културама MNC гајеним у RPMI/FBS медијуму за ћелијске културе: проценат ћелија са високом интензитетом флуоресцентних је 80% б) Дијаграм зависности броја ћелија од интензитета флуоресценце CFSE у културама MNC у присуству CIC болесне телади: проценат ћелија са високом интензитетом флуоресцентних је смањен на 60%.

4.3.12 Статистичка анализа

Резултати испитивања обрађени су стандардним статистичким методама коришћењем *Microsoft Office Excel* програмског пакета. Израчунате су средња вредност, стандардна девијација, медијана, минимална и максимална вредност и коефицијент варијације у огледним групама. Резултати су груписани у статистичке серије и приказани у виду табела и хистограма. За оцену статистичке значајности разлика средњих вредности/медијана скупова је прво утврђивања значајности разлика између варијанси два скупа F тестом, а затим је примењен неупарени, двосмерни T-тест (са Welch's корекцијом ако је разлика варијанси била значајна). За оба теста вредност вероватноће (p) мања од 0,05 означена као статистички значајна. Корелација вредности различитих скупова је одређена *Spearman-rank* корелационим тестом (интерактивни софтвер; http://vassarstats.net/corr_rank.html).

5. ЛИТЕРАТУРА

1. Montgomery D. Bovine respiratory disease and diagnostic veterinary medicine (managing respiratory diseases in the herd). Range beef cow symposium. 2009, 280.
2. Czuprynski CJ. Host response to bovine respiratory pathogens. *Anim Health Res Rev.* 2009, 10: 141-143.
3. Tóthová C, Nagy O, Kovac G. The serum protein electrophoretic pattern and acute phase protein concentrations in calves with chronic respiratory diseases. *Acta Veterinaria-Beograd.* 2013, 63: 473-486.
4. DeRosa DC, Mechor GD, Staats JJ, Chengappa MM, Shryock TR. Comparison of *Pasteurella spp.* simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *J Clin Microbiol.* 2000, 38: 327–332.
5. Taylor JD, Holland BP, Step DL, Payton ME, Confer AW. Nasal isolation of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* as predictors of respiratory disease in shipped calves. *Res Vet Sci.* 2015, 99: 41–45.
6. Yates WD: A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med.* 1982, 46: 225-263.
7. Mosier D. Review of BRD pathogenesis: the old and the new. *Anim Health Res Rev.* 2014, 15: 166-168.
8. Hinds CA, Niehaus AJ, Premanandan C, Rajala-Schultz PJ, Rings DM, Lakritz J. Characterization of the contributions of Hp-MMP 9 to the serum acute phase protein response of lipopolysaccharide challenged calves. *BMC Vet Res.* 2014, 10: 261.
9. Corbeil LB, Watt B, Corbeil RR, Betzen TG, Brownson RK, Morrill JL: Immunoglobulin concentrations in serum and nasal secretions of calves at the onset of pneumonia. *Am J Vet Res.* 1984, 45: 773-778.
10. Nikunen S, Härtel H, Orro T, Neuvonen E, Tanskanen R, Kivelä SL, Sankari S, Aho P, Pyörälä S, Saloniemi H, Soveri T: Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007, 30: 143-151.
11. Orro T, Pohjanvirta T, Rikula U, Huovilainen A, Alasuutari S, Sihvonen L, Pelkonen S, Soveri T. Acute phase protein changes in calves during an outbreak of respiratory disease caused by bovine respiratory syncytial virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2011, 34: 23-29.
12. Al-Quadah KM. Oxidative stress in calves with acute or chronic bronchopneumonia. *Revue Méd Vét.* 2009, 160: 231-236.

13. Fratrić N, Gvozdić D, Vuković D, Savić O, Buač M, Ilić V. Evidence that calf bronchopneumonia may be accompanied by increased sialylation of circulating immune complexes` IgG. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012, 150: 161–168.
14. Hanthorn CJ, Dewell GA, Dewell RD, Cooper VL, Wang C, Plummer PJ, Lakritz J. Serum concentrations of haptoglobin and haptoglobin-matrix metalloproteinase 9 (Hp-MMP 9) complexes of bovine calves in a bacterial respiratory challenge model. *BMC Vet Res.* 2014, 10: 285.
15. Almujaalli AM, El-Deeb WM, Eljalii EM, Fouda TA, AlBlwy M. Clinical, biochemical and bacteriological investigation of pneumonia in calves with special reference to alpha-1-acid glycoprotein response. *Int J Vet Health Sci Res.* 2015, 3: 60-63.
16. Abdallah A, Hewson J, Francoz D, Selim H, Buczinski S. Systematic review of the diagnostic accuracy of haptoglobin, serum amyloid A, and fibrinogen versus clinical reference standards for the diagnosis of bovine respiratory disease. *Journal Vet Intern Med.* 2016, 30: 1356-1368.
17. Buač M, Mojsilović S, Mišić D, Vuković D, Savić O, Valčić O, Marković D, Gvozdić D, Ilić V, Fratrić N. Circulating immune complexes of calves with bronchopneumonia modulate the function of peripheral blood leukocytes: In vitro evaluation. *Res Vet Sci.* 2016, 106: 135-142.
18. Kovačić M, Marković D, Maslovarić I, Obrenović S, Grujić-Milanović J, Arsić A, Milanović Z, Savić O, Fratrić N, Ilić V. Serum proteins and lipids in mild form of calf bronchopneumonia: candidates for reliable biomarkers. *Acta Veterinaria- Beograd.* 2017, 67: 207-227.
19. Srikumaran S, Kelling LC, Ambagala A. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. *Animal Health Reasearch Reviews.* 2007, 8: 215-229.
20. Grissett GP, White BJ, Larson RL. Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex. *J Vet Intern Med.* 2015, 29: 770–780.
21. Dabo SM, Taylor JD, Confer AW, *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev.* 2007, 8: 129–150.
22. Confer AW. Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Anim Health Res Rev.* 2009, 10: 145–148.
23. Griffin D, Chengappa MM, Kuszak J, McVey DS. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin Food Anim.* 2010, 26: 381–394.
24. Fratrić N, Buač M, Nadaškić M, Ilić V, Vuković D, Gvozdić D, Đoković R, Mišić D. Bronchopneumonia in dairy calves associated with *Pasteurella multocida* – three years epidemiological survey. XIV Middle European Buiatrics Congress, 25-27. Maj 2014, Varšava, Poljska, Proceedings, page 119.

25. Caswell JL. Failure of respiratory defenses in the pathogenesis of bacterial pneumonia of cattle. *Vet Pathol.* 2014, 51: 393-409.
26. Dabo SM, Confer A, Montelongo M, York P, Wyckoff JH 3rd. Vaccination with *Pasteurella multocida* recombinant OmpA induces strong but non-protective and deleterious Th2-type immune response in mice. *Vaccine.* 2008, 26: 4345-4351.
27. Wilson BA, Ho M. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013, 26: 631-655.
28. Harper M, Boyce JD. The Myriad Properties of *Pasteurella multocida* Lipopolysaccharide. *Toxins* (Basel). 2017, 9: e254.
29. <http://www.sciencephoto.com/media/875981/view>
30. Gallego C, Romero S, Esquinas P, Patiño P, Martínez N, Iregui C. Assessment of *Pasteurella multocida* a lipopolysaccharide, as an adhesin in an in vitro model of rabbit respiratory epithelium. *Vet Med Int.* 2017, 2017:8967618.
31. Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett.* 2006, 265: 1-10.
32. Hatfaludi T, Al-Hasani K, Boyce JD, Adler B. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol.* 2010, 144: 1-17.
33. Iovane G, Galdiero M, Vitiello M, De Martino L. Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins on bovine neutrophils. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998, 20: 29-36.
34. Galdiero M, Folgore A, Nuzzo I, Galdiero E. Neutrophil adhesion and transmigration through bovine endothelial cells in vitro by protein H and LPS of *Pasteurella multocida*. *Immunobiology.* 2000, 202: 226-238.
35. Periasamy S, Praveena PE, Singh N. Effects of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharides on bovine leukocytes. *Microb Pathog.* 2018, 119: 225-232.
36. Harper M, St Michael F, John M, Vinogradov E, Steen JA, van Dorsten L, Steen JA, Turni C, Blackall PJ, Adler B, Cox AD, Boyce JD. *Pasteurella multocida* Heddleston serovar 3 and 4 strains share a common lipopolysaccharide biosynthesis locus but display both inter- and intrastrain lipopolysaccharide heterogeneity. *J Bacteriol.* 2013, 195: 4854-4864.
37. Pouedras P, Andre PM, Donnio PY, Avril JL. Cleavage of immunoglobulin A1, A2 and G by proteases from clinical isolates of *Pasteurella multocida*. *J Med Microbiol.* 1992, 37: 128-132.
38. Negrete-Abascal E, Tenorio VR, de la Garza M. Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Curr Microbiol.* 1999, 38: 64-67.

39. Fernández-Rojas MA, Vaca S, Reyes-López M, de la Garza M, Aguilar-Romero F, Zenteno E, Soriano-Vargas E, Negrete-Abascal E. Outer membrane vesicles of *Pasteurella multocida* contain virulence factors. *Microbiologyopen*. 2014, 3: 711-717.
40. Prado ME, Prado TM, Payton M, Confer AW. Maternally and naturally acquired antibodies to *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006, 111 :301-307.
41. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology (6th edition), Saunders, Elsevier Comp, Philadelphia, PA. 2007.
42. Nezlin R. The Immunoglobulins. Structure and Function. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 1998.
43. <https://oncohemakey.com/antobody-structure>
44. Spearman M, Dionne B, Butler M. The role of glycosylation in therapeutic antibodies. *Antibody Expression and Production*. 2011, 7: 251-292.
45. <https://bio-protocol.org/e1886>
46. Butler JE. Bovine immunoglobulins: An augmented review. *Vet Immunol Immunopathol*. 1983, 4: 43–152.
47. Zhao Y, Jackson SM, Aitken R: The bovine antibody repertoire. *Dev Comp Immunol*. 2006, 30: 175-186.
48. Wang F, Ekiert DC, Ahmad I, Yu W, Zhang Y, Bazirgan O, Torkamani A, Raudsepp T, Mwangi W, Criscitiello MF, Wilson IA, Schultz PG, Smider VV. Reshaping antibody diversity. *Cell*. 2013, 153: 1379-1393.
49. Walther S. Organization and transcription analyses of the immunoglobulin genes in cattle and horses. PhD disertaion, Faculty of Agricultural Sciences, Georg-August-University Göttingen, Germany, 2016.
50. Stanfield RL, Wilson IA, Smider VV. Conservation and diversity in the ultralong third heavy-chain complementarity-determining region of bovine antibodies. *Sci Immunol*. 2016, 1(1). pii: aaf7962.
51. Haakenson JK, Huang R, Smider VV. Diversity in the Cow Ultralong CDR H3 Antibody Repertoire. *Front Immunol*. 2018, 9: 1262.
52. Sok D, Le KM, Vadnais M, Saye-Francisco KL, Jardine JG, Torres JL, Berndsen ZT, Kong L, Stanfield R, Ruiz J, Ramos A, Liang CH, Chen PL, Criscitiello MF, Mwangi W, Wilson IA, Ward AB, Smider VV, Burton DR. Rapid elicitation of broadly neutralizing antibodies to HIV by immunization in cows. *Nature*. 2017, 548: 108-111.
53. Corbeil LB, Gogolewski RP, Kacskovics I, Nielsen KH, Corbeil RR, Morrill JL, Greenwood R, Butler JE. Bovine IgG2a antibodies to *Haemophilus somnus* and allotype expression. *Can J Vet Res*. 1997, 61: 207–213.

54. Larson BL, Heary HL Jr, Devery JE. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J Dairy Sci.* 1980, 63: 665-671.
55. Tizard IR. Veterinary immunology. 9th edn. Elsevier, St Louis, USA, 2013.
56. Mayer B, Kis Z, Frenyó LV, Hammarström L, Kacsokovics I. The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung. *Vet Immunol Immunop.* 2004, 98: 85-89.
57. Nansen P. Metabolism of bovine immunoglobulin-G. A clinical and pathophysiological study. Thesis, Kgl. Veterinaer og Land-bohojskole, Copenhagen, Denmark, 1970.
58. Corbeil LB. Antibodies as effectors. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002, 87: 169-175.
59. Kickofen B, Hammer DK, Scheel D. Isolation and characterization of gamma G type immunoglobulins from bovine serum and colostrum. *Hoppe-seyler's Z Physiol Chem.* 1968, 349: 1755-1773.
60. Vukotić M. Neki vidovi heterogenosti imunoglobulina G govečeta. Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1972.
61. Mayans MO, Coadwell WJ, Beale D, Symons DB, Perkins SJ. Demonstration by pulsed neutron scattering that the arrangement of the Fab and Fc fragments in the overall structures of bovine IgG1 and IgG2 in solution is similar. *Biochem J.* 1995, 311: 283-291.
62. Isenberg DA, Rademacher TW. Abnormalities of IgG glycosylation and immunological disorders. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1996.
63. Jefferis R, Lund J. Glycosylation of antibody molecules: structural and functional significance. *Chem Immunol.* 1997, 65: 111-128.
64. Jefferis R. Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics. *Biotechnol Prog.* 2005a, 21: 11-16.
65. Jefferis R. Glycosylation of natural and recombinant antibody molecules. *Adv Exp Med Biol.* 2005b, 564: 143-148.
66. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol.* 2007, 25 :21-50.
67. Saba JA, Kunkel JP, Jan DC, Ens WE, Standing KG, Butler M, Jamieson JC, Perreault H. A study of immunoglobulin G glycosylation in monoclonal and polyclonal species by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2002, 305: 16-31.
68. Fujii S, Nishiura T, Nishikawa A, Miura R, Taniguchi N. Structural heterogeneity of sugar chains in immunoglobulin G. Conformation of immunoglobulin G molecule and substrate specificities of glycosyltransferases. *J Biol Chem.* 1990, 265: 6009-6018.

69. Widders PR, Paisley LG, Gogolewski RP, Evermann JF, Smith JW, Corbeil LB. Experimental abortion and the systemic immune response to "*Haemophilus somnus*" in cattle. *Infect Immun*. 1986, 54: 555-560.
70. Gogolewski RP, Schaefer DC, Wasson SK, Corbeil RR, Corbeil LB. Pulmonary persistence of *Haemophilus somnus* in the presence of specific antibody. *J Clin Microbiol*. 1989, 27: 1767-1774.
71. Gogolewski RP, Kania SA, Liggitt HD, Corbeil LB. Protective ability of antibodies against 78- and 40-kilodalton outer membrane antigens of *Haemophilus somnus*. *Infect Immun*. 1988, 56: 2307-2316.
72. McBride JW, Wozniak EJ, Brewer AW, Naydan DK, Osburn BI. Evidence of *Pasteurella haemolytica* linked immune complex disease in natural and experimental models. *Microb Pathog*. 1999, 26: 183-193.
73. Mulongo M, Frey J, Smith K, Schnier C, Wesonga H, Naessens J, McKeever D. Vaccination of cattle with the LppQ-N' sub-unit of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* results in type III immune complex disease upon experimental infection. *Infect Immun*. 2015, 83: 1992-2000.
74. Bournazos S, DiLillo DJ, Ravetch JV. The role of Fc-FcγR interactions in IgG-mediated microbial neutralization. *The Journal of Experimental Medicine*. 2015, 212: 1361-1399.
75. Wang TT, Ravetch JV. Immune complexes: not just an innocent bystander in chronic viral infection. *Immunity*. 2015, 42: 213-215.
76. Rajnavölgyi E, Reth M, Uher F, Miklós K, Gergely J, Rajewsky K. Fc-dependent effector functions of idiotype-anti-idiotype immune complexes. *Mol Immunol*. 1984, 21:127-136.
77. Rajnavölgyi E, Fazekas G, Lund J, Daeron M, Teillaud JL, Jefferis R, Fridman WH, Gergely J. Activation of effector functions by immune complexes of mouse IgG2a with isotype-specific autoantibodies. *Immunology*. 1995, 84: 645-652.
78. Fratrić N, Milošević-Jovčić N, Ilić V, Stojić V, The levels of immune complexes in the blood sera of calves in neonatal period and adult cattle. *Acta Veterinaria Beograd*. 2006, 56: 103-110.
79. Holloway Y, Snijder J, Boersma GW. Demonstration of circulating pneumococcal immunoglobulin G immune complex in patients with community- acquired pneumonia by means of an enzyme- linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. 1993, 31: 3247-3254.
80. Korppi M, Leinonen M, Ruuskanen O. Pneumococcal serology in children's respiratory infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008, 27: 167-175.
81. Poulton TA, Mooney NA, Nineham LJ, Hay FC. Characteristics of immune complexes detectable by two independent assays in gynaecological malignancies. *Clin Exp Immunol*. 1983, 53: 573-580.

82. Fratrić N, Ilić V, Gvozdić D, Vuković D, Savić O, Jagličić I: A hematological profile and plasma proteins of three months old calves with clinical signs of bronchopneumonia. *Veterinarska stanica*. 2011, 42: 72-77.
83. Mellencamp AM, Preheim CL, McDonald LT. Isolation and characterization of circulating immune complexes from patients with pneumococcal pneumonia. *Infect Immun*. 1987, 55: 1737-1742.
84. Mizutani H, Mizutani H. Circulating immune complexes in patients with mycoplasmal pneumonia. *Am Rev Respir Dis*. 1984, 130:627-629.
85. Mizutani H, Mizutani H. Immunoglobulin M rheumatoid factor in patients with mycoplasmal pneumonia. *Am Rev Respir Dis*. 1986, 134: 1237-1240.
86. Adler Y, Lamour A, Jamin C, Menez JF, Le Corre R, Shoenfeld Y, Youinou P. Impaired binding capacity of asialyl and agalactosyl IgG to Fc gamma receptors. *Clin Exp Rheumatol*. 1995, 13: 315-319.
87. Scallon BJ, Tam SH, McCarthy SG, Cai AN, Raju TS. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol Immunol*. 2007, 44: 1524-1534.
88. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 2006, 313: 670-673.
89. Mulligan MS, Lowe JB, Larsen RD, Paulson J, Zheng ZL, DeFrees S, Maemura K, Fukuda M, Ward PA. Protective effects of sialylated oligosaccharides in immune complex-induced acute lung injury. *J Exp Med*. 1993, 178: 623-631.
90. Ward PA, Fattahi F, Bosmann M. New insights into molecular mechanisms of immune complex-induced injury in lung. *Frontiers in Immunology*. 2016, 7: 86.
91. Gao H, Neff T, Ward PA. Inflammation in the model of IgG immune-complex injury. *Annu Rev Pathol*. 2006, 1: 215-242.
92. Rittirsch D, Flierl MA, Day DE, Nadeau BA, McGuire SR, Hoesel LM, Ipaktchi K, Zetoune FS, Sarma JV, Leng L, Huber-Lang MS, Neff TA, Bucala R, Ward PA. Acute lung injury induced by lipopolysaccharide is independent of complement activation. *J Immunol*. 2008, 180: 7664-7672.
93. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008, 8: 349-361.
94. Dooley JL, Abdel-Latif D, St Laurent CD, Puttagunta L, Befus D, Lacy P. Regulation of inflammation by Rac2 in immune complex-mediated acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009, 297: L1091-L1102.
95. Sun L, Guo RF, Gao H, Sarma JV, Zetoune FS, Ward PA. Attenuation of IgG immune complex-induced acute lung injury by silencing C5aR in lung epithelial cells. *FASEB J*. 2009, 23: 3808-3818.

96. Ward PA. Oxidative stress: acute and progressive lung injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2010, 1203: 53-59.
97. Loebbermann J, Thornton H, Durant L, Sparwasser T, Webster KE, Sprent J, Culley, FJ, Johansson C, Openshaw PJ. Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal Immunol.* 2012, 5: 161-172.
98. Xie T, Liang J, Liu N, Wang Q, Li Y, Noble PW, Jiang D. MicroRNA-127 inhibits lung inflammation by targeting IgG Fc γ receptor I. *J Immunol.* 2012, 188: 2437-2444.
99. Bosmann M, Grailer JJ, Ruemmler R, Russkamp NF, Zetoune FS, Sarma JV, Standiford TJ, Ward PA. Extracellular histones are essential effectors of C5aR- and C5L2-mediated tissue damage and inflammation in acute lung injury. *The FASEB Journal.* 2013, 27: 5010-5021.
100. Yan C, Ward PA, Wang X, Gao H. Myeloid depletion of SOCS3 enhances LPS-induced acute lung injury through CCAAT/enhancer binding protein δ pathway. *FASEB J.* 2013, 27: 2967-2976.
101. Grailer JJ, Canning BA, Kalbitz M, Haggadone MD, Dhond RM, Andjelkovic AV, Zetoune FS, Ward PA. Critical role for the NLRP3 inflammasome during acute lung injury. *J Immunol.* 2014, 192: 5974-5983.
102. Quinton LJ, Mizgerd JP. Dynamics of lung defense in pneumonia: resistance, resilience, and remodeling. *Annu Rev Physiol.* 2015, 77: 407-430.
103. Gallin JI, Kaye D, O'Leary WM. Serum lipids in infection. *N Engl J Med.* 1969, 281: 1081-1086.
104. Vitić J. Sastav serumskih lipoproteida nekih sisara i promene lipoproteida pod uslovima eksperimentalno izazvanih dislipidemija. Doktorska disertacija. Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu, 1983.
105. Murch O, Collin M, Hinds CJ, Thiemermann C. Lipoproteins in inflammation and sepsis. I. Basic science. *Intensive Care Med.* 2007, 33: 13-24.
106. Pirillo A, Catapano AL, Norata GD. HDL in infectious diseases and sepsis. *Handb Exp Pharmacol.* 2015, 224: 483-508.
107. Alvarez C, Ramos A. Lipids, lipoproteins, and apoproteins in serum during infection. *Clin Chem.* 1986, 32: 142-145.
108. Dowhan W, Bogdanov M. Functional roles of lipids in membranes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (4th Edition)*, (edited by D.E. Vance and J.E. Vance, Elsevier Science). 2002, pp. 1-35.
109. Feingold KR, Grunfeld C. *Introduction to Lipids and Lipoproteins.* 2018.
110. Jenkins KJ, Griffith G, Kramer JKG. Plasma lipoproteins in neonatal, preruminant, and weaned calf. *J Dairy Sci.* 1988, 71: 3003-3012.

111. Civelek T, Kav K, Camkerten I, Celik HA, Acar A. Effects of bacterial pneumonia in neonatal calves on serum lipids. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2007, 51: 503-507.
112. Joshi V, Gupta VK, Dimri U, Mandal RSK, Sharma DK. Evaluating serum lipid profile in bacterial bovine respiratory disease (BRD) affected calves. *Intas Polivet*. 2015, 16: 187-188.
113. Pablo MA, Puertollano MA, Cienfuegos GA. Immune cell functions, lipids and host natural resistance. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2000, 29: 323-328.
114. Stulnig TM, Zeyda M. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: impact on T-cell signaling. *Lipids*. 2004, 39: 1171-1175.
115. O'Donnell VB, Murphy RC, FitzGerald GA. Lipids and inflammation. *Inflammation*. 2018, pp. 79-124.
116. Gao S, Zhang R, Greenberg ME, Sun M, Chen X, Levison BS, Salomon RG, Hazen SL. Phospholipid hydroxyalkenals, a subset of recently discovered endogenous CD36 ligands, spontaneously generate novel furan-containing phospholipids lacking CD36 binding activity in vivo. *J Biol Chem*. 2006a, 281: 31298-31308.
117. Hazen SL. Oxidized phospholipids as endogenous pattern recognition ligands in innate immunity. *J Biol Chem*. 2008, 283:15527-15531.
118. Lopes-Virella MF, Baker NL, Hunt KJ, Lyons TJ, Jenkins AJ, Virella G. High concentrations of AGE-LDL and oxidized LDL in circulating immune complexes are associated with progression of retinopathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2012a, 35: 1333-1340.
119. Lopes-Virella MF, Hunt KJ, Baker NL, Virella G, Moritz T. The levels of MDA-LDL in circulating immune complexes predict myocardial infarction in the VADT study. *Atherosclerosis*. 2012b, 224: 526-531.
120. Sobenin IA, Salonen JT, Zhelankin AV, Melnichenko AA, Kaikkonen J, Bobryshev YV, Orekhov AN. Low density lipoprotein-containing circulating immune complexes: role in atherosclerosis and diagnostic value. *Biomed Res Int*. 2014, 2014: 205697.
121. Rhoads JP, JLuken JR, Wilhelm AJ, Moore JL, Mendez-Fernandez Y, Thirumala-Devi Kanneganti TD, Major AS. Oxidized low-density lipoprotein immune complex priming of the Nlrp3 inflammasome involves TLR and FcγR cooperation and is dependent on CARD9. *J Immunol*. 2017, 198: 2105-2114.
122. Al Gadban MA, Smith KJ, Soodavar F, Piansay C, Chassereau C, Twall WO, Klein RL, Virella G, Lopes-Virella MF, Hammad SM. Differential trafficking of oxidized LDL and oxidized LDL immune complexes in macrophages: impact on oxidative stress. *PLoS ONE*. 2010, 5: e12534.
123. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest*. 2006, 116: 1218-1222.

124. Lappalainen J, Lindstedt K.A., Oksjoki R, Kovanena PT. OxLDL-IgG immune complexes induce expression and secretion of proatherogenic cytokines by cultured human mast cells. *Atherosclerosis*. 2011, 214: 357–363.
125. Abdelsamie SALi Y, Huang Y, Lee MH, Klein RL, Virella G, Lopes-Virella MF. Oxidized LDL immune complexes stimulate collagen IV production in mesangial cells via Fc gamma receptors I and III. *Clin Immunol*. 2011, 139: 258-266.
126. Kronborg G. Lipopolysaccharide (LPS), LPS-immune complexes and cytokines as inducers of pulmonary inflammation in patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *APMIS Suppl*. 1995, 50: 1-30.
127. Monay NA, Hay FC, Poulton TA. A comparative study of complement components in polyethylene glycol precipitated immune complexes from patients with ovarian cancer and patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 1983, 52: 561-568.
128. Robinson MW, Scott DG, Bacon PA, Walton KW, Coppock JS, Scott DL. What proteins are present in polyethylene glycol precipitates from rheumatic sera? *Ann Rheum Dis*. 1989, 48: 496-501.
129. Elshafie AI, Åhlin E, Mathsson L, ElGhazali G, Rönnelid J. Circulating immune complexes (IC) and IC-induced levels of GM-CSF are increased in Sudanese patients with acute visceral *Leishmania donovani* infection undergoing sodium stibogluconate treatment: Implications for disease pathogenesis. *J Immunol*. 2007, 178: 5383–5389.
130. Mathsson L, Åhlin E, Sjöwall C, Skogh T, Rönnelid J. Cytokine induction by circulating immune complexes and signs of in-vivo complement activation in systemic lupus erythematosus are associated with the occurrence of anti-Sjögren's syndrome A antibodies. *Clin Exp Immunol*. 2007, 147: 513–520.
131. Lock RJ, Unsworth DJ. Measurement of immune complexes is not useful in routine clinical practice. *Ann Clin Biochem*. 2000, 37: 253-261.
132. Nash JT, Davies KA. Complement and Immune Complexes. *Methods Mol Biol*. 2000, 150: 203-214.
133. Nikolić V, Živanović Lj, Stojić V, Vukotić M. The evaluation of some techniques for detection of circulating immune complexes in cattle serum. *Acta Veterinaria-Beograd*. 1981, 31: 205-212.
134. Fratrić N. Fizičko-hemijske i imuno-hemijske karakteristike imunih kod goveda. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, 2004.
135. Hexley P, Robinson CT, Osterburg AR, Babcock GF. Circulating microparticles do not all share biophysical light scatter properties with immune complexes when analyzed by flow cytometry. *Blood*. 2012, 120: 1528-1529.
136. Lu HL, Lin DQ, Zhu MM, Yao SJ. Effects of ligand density and pore size on the adsorption of bovine IgG with DEAE ion-exchange resins. *J Sep Sci*. 2012, 35: 2131–2137.

137. Rajala P, Castrén H. Serum immunoglobulin concentrations and health of dairy calves in two management systems from birth to 12 weeks of age. *J Dairy Sci.* 1995, 78: 2737-2744.
138. Fratrić N, Ilić V, Milošević-Jovčić N, Stojić V. Electrophoretic and immunoelectrophoretic characteristics of IgG as a constituents of PEG precipitable immune complexes in preruminant calves` sera. *Acta Veterinaria Beograd.* 2010, 60: 155-164.
139. Merriman MJ. Serum immunoglobulins in newborn calves before and after colostrum feeding. *Can J Comp Med.* 1971, 35: 269-273.
140. Putnam FW. The plasma proteins structure, function, and genetic control. Second edition. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1975.
141. Fang WD, Mukkur TK. Physiochemical characterization of proteolytic cleavage fragments of bovine colostrum immunoglobulin G1 (IgG1). *Biochem J.* 1976, 155: 25-30.
142. Chase CC, Hurley DJ, Reber AJ. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2008, 24: 87-104.
143. Duncan JR, Wilkie BN, Hiestand F, Winter AJ. The serum and secretory immunoglobulins of cattle: characterization and quantitation. *J Immunol.* 1972, 108: 965-976.
144. Tsuji S, Kato H, Matsuoka Y, Fukushima T. Molecular weight heterogeneity of bovine serum transferrin. *Biochem Genet.* 1984, 22: 1145-1159.
145. Hirayama K, Akashi S, Furuya M, Fukuhara K. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990, 173: 639-646.
146. Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJ. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology.* 2000, 10: 477-486.
147. Weiss DJ, Wardrop KJ. Schalm's veterinary hematology. 6th ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 2010.
148. Ellison RT, Giehl TJ, LaForce FM. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect Immun.* 1988, 56: 2774-2781.
149. Lankinen KS, Ruutu P, Nohynek H, Lucero M, Paton JC, Leinonen M. Pneumococcal pneumonia diagnosis by demonstration of pneumolysin antibodies in precipitated immune complexes, a study in 350 Philippine children with acute lower respiratory infection. *Scand J Infect Dis.* 1999, 31: 155-161.
150. Moore JS, Wu X, Kulhavy R, Tomana M, Novak J, Moldoveanu Z, Brown R, Goepfert PA, Mestecky J. Increased levels of galactose-deficient IgG in sera of HIV-1-infected individuals. *AIDS.* 2005, 19: 381-389.

151. Hamilton RG. The human IgG subclasses, Calbiochem-Novabiochem Corporation: San Diego, CA, USA, 2001.
152. Scherer HU, Wang J, Toes RE, van der Woude D, Koeleman CA, de Boer AR, Huizinga TW, Deelder AM, Wuhrer M. Immunoglobulin 1 (IgG1) Fc- glycosylation profiling of anti-citrullinated peptide antibodies from human serum. *Proteomics Clin Appl.* 2009, 3: 106-115.
153. Nikolić V, Milošević-Jovčić N, Šušaković M, Miletić V. Distribution of four IgG Gm antigens in different experimental IgG samples. *Vox Sang.* 1979, 37: 257–261.
154. Akerström B, Brodin T, Reis K, Björck L. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immunol.* 1985, 135: 2589-2592.
155. Goudswaard J, van der Donk JA, Noordzij A, van Dam RH, Vaerman JP. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. *Scand J Immunol.* 1978, 8: 21-28.
156. Kanamaru Y, Nagaoka S, Kuzuya Y. Protein A reactive subpopulation of bovine immunoglobulin G1: A comparative study of serum and colostrum immunoglobulin G. *Anim Sci Technol.* 1992, 63: 1142-1152.
157. Schmerr MJ, Patterson JM, Van der Maaten MJ, Miller JM. Conditions for binding bovine IgG1 to protein A-Sepharose. *Mol Immunol.* 1985, 22: 613-616.
158. Lee CW, Shewen PE. Evidence of bovine immunoglobulin G1 (IgG1) protease activity in partially purified culture supernate of *Pasteurella haemolytica* A1. *Can J Vet Res.* 1996, 60: 127-132.
159. Kerr MA. The complement system. *Biochemical Education* 1981, 9: 82-88.
160. Sharma NC, Mohammad SF, Chuang HY, Mason RG. Albumin-IgG complexes in human serum and plasma that inhibit blood platelet adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981, 78: 7750–7753.
161. Zhen QY, Walther S, Sodomann CP. Small albumin-immunoglobulin complexes in patients with liver disease. *Immunology.* 1983, 48: 809–816.
162. Louzir H, Ternynck T, Gorgi Y, Tahar S, Ayed K, Avrameas S. Autoantibodies and circulating immune complexes in sera from patients with hepatitis B virus-related chronic liver disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992, 62: 160-167.
163. Bhat S, Jagadeeshaprasad MG, Patil YR, Shaikh ML, Regin BS, Mohan V, Giri AP, Balasubramanyam M, Boppana R, Kulkarni MJ. Proteomic insight reveals elevated levels of albumin in circulating immune complexes in diabetic plasma. *Mol Cell Proteomics.* 2016, 15: 2011-2020.
164. Gallango ML, Caldera LH, Suinaga R, Ramírez M. Co-occurrence of albumin complexes with IgE and IgG in the serum of an IgE myeloma patient. *Acta Haematol.* 1982, 68: 295-299.

165. Vitić J, Nikolić V. Sastav rastvorljivih imunokompleksa otkrivenih u serumima zamorčiča hranjenih hranom koja sadrži dosta holesterola. Zbornik radova III simpozijuma o hiperlipoproteinemijama. 1982, 313-315.
166. Holst E, Rollof J, Larsson L, Nielsen JP. Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. *J Clin Microbiol.* 1992, 30:2984-2987.
167. Caldari-Torres C, McGilliard ML, Corl BA. Esterification of essential and non-essential fatty acids into distinct lipid classes in ruminant and non-ruminant tissues. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2016, 200: 1-5.
168. Emau P, Giri SN, Bruss ML. Viral-bacterial pneumonia in calves: effects on plasma eicosanoids and long chain fatty acids. *Int J Tissue React.* 1987a; 9:199-214.
169. Emau P, Giri SN, Bruss ML. Effects of smooth and rough *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharides on plasma cyclic-nucleotides and free fatty acids in calves. *Vet Microbiol.* 1987b, 15: 279-292.
170. Celi P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2011, 33: 233-440.
171. Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 2007, 173: 502-511.
172. Joshi V, Gupta VK, Bhanuprakash AG, Mandal RSK, Dimri U, Ajith Y. Haptoglobin and serum amyloid A as putative biomarker candidates of naturally occurring bovine respiratory disease in dairy calves. *Microb Pathog.* 2018, 116: 33-37.
173. Oez S, Welte K, Platzer E, Kalden JR. A simple assay for quantifying the inducible adherence of neutrophils. *Immunobiology.* 1990, 180: 308-315.
174. Vlaški M, Krstić A, Jovčić G, Bugarski D, Petakov M, Stojanović N, Milenković P. Effects of IL-17 on functional activity of peripheral blood cells. *Acta Veterinaria-Beograd.* 2004, 54: 249-261.
175. <https://www.biocat.com/cell-biology/apoptosis/apoptosis-detection-phosphatidylserin-annexin-based>
176. <https://www.abcam.com/protocols/flow-cytometric-analysis-of-cell-cycle-with-propidium-iodide-dna-staining>
177. Parish CR, Warren HS. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. In: *Current Protocols in Immunology.* 2002, Chapter 4, Unit 4.9.
178. Dobričić V, Drvenica I, Stančić A, Mihailović M, Čudina O, Bugarski D, Ilić V. Investigation of metabolic properties and effects of 17 β -carboxamide glucocorticoids on human peripheral blood leukocytes. *Arch Pharm (Wienheim).* 2018, 351: e1700371.

179. Oldham KT, Guice KS, Ward PA, Johnson KJ. The role of oxygen radicals in immune complex injury. *Free Radic Bio Med.* 1988, 4: 387-397.
180. Higuchi H, Nagahata H. Comparison of superoxide production, protein kinase C and tyrosine kinase activities in neutrophils from neonatal calves and cows. *Res Vet Sci.* 1998, 65: 139-143.
181. Haslett C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999, 160: S5-S11.
182. Gamberale R, Giordano M, Trevani AS, Andonegui G, Geffner JR. Modulation of human neutrophil apoptosis by immune complexes. *J Immunol.* 1998, 161: 3666-3674.
183. Hart SP, Alexander KM, Dransfield I. Immune complexes bind preferentially to Fc gamma RIIA (CD32) on apoptotic neutrophils, leading to augmented phagocytosis by macrophages and release of proinflammatory cytokines. *J Immunol.* 2004, 172: 1882-1887.
184. Miles K, Clarke DJ, Lu W, Sibinska Z, Beaumont PE, Davidson DJ, Barr TA, Campopiano DJ, Gray M. Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of alpha-defensins. *J Immunol.* 2009, 183: 2122-2132.
185. Chattha KS, Firth MA, Hodgins DC, Shewen PE. Age related variation in expression of CD21 and CD32 on bovine lymphocytes: a cross-sectional study. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009, 130: 70-78.
186. Hussen J, Düvel A, Sandra O, Smith D, Sheldon IM, Zieger P, Schuberth HJ. Phenotypic and functional heterogeneity of bovine blood monocytes. *PLoS One.* 2013, 8: e71502.
187. Maślanka T. Effect of dexamethasone and meloxicam on counts of selected T lymphocyte subpopulations and NK cells in cattle - In vivo investigations. *Res Vet Sci.* 2014, 96: 338-446.
188. Kapur R, Einarsdottir HK, Vidarsson G. IgG-effector functions: "the good, the bad and the ugly". *Immunol Lett.* 2014, 160: 139-144.
189. Sarma JV, Ward PA. In vivo biological responses in the presence or absence of C3. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2007, 598: 240-250.
190. Kacs Kovics I. Fc receptors in livestock species. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004, 102: 351-362.
191. Chattha KS, Firth MA, Hodgins DC, Shewen PE. Variation in expression of membrane IgM, CD21 (CR2) and CD32 (Fc gamma RIIb) on bovine lymphocytes with age: a longitudinal study. *Dev Comp Immunol.* 2010, 34: 510-517.
192. Gvozdić D, Fratrić N, Ilić V, Vuković D. Rana dijagnoza pneumonije kod teladi – respiratorni skoring sistem. *Veterinarski žurnal Republike Srpske.* 2010, 10: 149-151.

193. Rupp C, Steckel H, Müller BW. Mixed micelle formation with phosphatidylcholines: The influence of surfactants with different molecule structures. *Int J Pharm.* 2010, 387: 120-128.
194. Fahey JL, Terry EW. Ion exchange chromatography and gel filtration of immunoglobulin. In: Weir DM (Ed), Handbook of experimental immunology. Immunochemistry, 3rd ed., Blackwell scientific publication, Oxford, London, 1978, 8: 1-16.
195. Sagan Z. The application of Rivanol for serum transferin and immunoglobulin G determination. *Clin Chim Acta.* 1968, 21: 225-230.
196. Johansson BG. Agarose gel electrophoresis. *Scand J Clin Lab Invest.* 1972, 29: 7-9.
197. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227: 680-685.
198. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972, 18: 499-502.
199. Cristopherson SM, Glass RZ. Preparaton of milk fat methylester by alcoholysis in an essentially non alcoholic solution. *J Dairy Sci.* 1969, 52: 1289-1290.
200. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 1999, 299: 15-27.
201. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond).* 1993, 84: 407-412.
202. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979, 95: 351-358.
203. Selmeçi L, Seres L, Antal M, Lukacs J, Regoly-Merei A, Acsady G. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. *Clin Chem Lab Med.* 2005, 43: 294-297

Биографски подаци кандидата

Маријана В. Ковачић (рођ. Буач) рођена је 15. новембра 1987. године у Книну, Република Хрватска. Основну школу и Средњу медицинску школу завршила је у Сремској Митровици. Хемијски факултет, Универзитета у Београду, смер дипломирани биохемичар уписала је школске 2006/2007 године. Дипломирала је 24.августа 2011. године одбраном завршног рада под називом „Анализа експресије N-ацетил глукозамина, галактозе, сијалинске киселине и фукозе на IgG из циркулишућих имунокомплекса код телади са бронхопнеумонијом, лектинским блотом“. Мастер студије на Хемијском факултету, Универзитета у Београду, студијски програм биохемија уписала је школске 2011/2012 године, а завршила 05.октобара 2012.године одбраном мастер рада под називом „Испитивање утицаја циркулишућих имунокомплекса телади на карактеристике леукоцита периферне крви телади и крава“. Докторске студије на Хемијском факултету Универзитета у Београду, студијски програм биохемија уписала је школске 2012/2013 године.

У Институту за медицинска истраживања, Универзитета у Београду запослена је од 04.децембра 2014. године као истраживач сарадник на пројекту „Испитивање патогенезе хематолошких малигнитета” (175053) финансираном од стране Министарства просвета, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Као резултат досадашњег рада Маријана В. Ковачић је објавила 26 библиографских јединица. Од публикованих радова, један (1) рад је штампан у целини у међународном часопису истакнутих вредности (M21a), два (2) рада штампана у врхунском међународном часопису (M21), четири (4) рада публикована у истакнутом међународном часопису (M22), један (1) рад је штампан у међународном часопису (M23), једно (1) саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33), седамнаест (17) радова је штампано у форми саопштења са међународног скупа штампаних у изводу (M34) и два (2) рада са скупова националног значаја штампаних у изводу (M64).

Члан је Биохемијског друштва Србије, Српског хемијског друштва и Европског друштва хематолога.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора

Маријана В. Ковачић

Број индекса

ДБ37/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Структурне и функционалне особине имунокомплекса код телади оболеле од
bronhopнеумоније**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 28. септембар 2018. године.

Маријана Ковачић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Маријана В. Ковачић
Број индекса ДБ 37/2012
Студијски програм доктор биохемијских наука
Наслов рада

Структурне и функционалне особине имунокомплекса код телади оболеле од бронхопнеумоније

Ментор проф. др Зоран Вујчић и научни саветник др Весна Илић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 28. септембар 2018. године

Маријана Ковачић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Структурне и функционалне особине имунокомплекса код телади оболеле од bronhopneumonije

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Краак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 28. септембар 2018. године

Маријана Ковачић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.