

# Francisella novicida-određivanje citopatskog učinka na stanice ameba i makrofaga

---

Tić, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:333225>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Iva Tić

*FRANCISELLA NOVICIDA*- ODREĐIVANJE  
CITOPATSKOG UČINKA NA STANICE AMEBA I  
MAKROFAGA

Završni rad

Rijeka, 2020.

**Mentor rada: Prof.dr.sc. Marina Šantić**

**Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_,  
pred povjerenstvom u sastavu:**

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_ **dr. sc. Mateja Ožanić** \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_ **Prof. dr. sc. Marina Šantić** \_\_\_\_\_

Rad sadrži **42** stranice, **9** slika, **1** tablicu, **84** literaturnih navoda.

## **ZAHVALA**

**Veliko hvala mentorici prof.dr.sc. Marini Šantić na temi, uloženom trudu i strpljenju te dr.sc Valentini Marečić na korisnim savjetima i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela završnog rada.**

**Zahvaljujem se od srca svojoj najboljoj prijateljici na ohrabrivanju i poticanju da dam najbolje od sebe, kako tijekom pisanja ovog završnog rada, tako i tijekom svih prethodnih godina obrazovanja.**

**Na posljetku, najveća hvala mojim roditeljima koji su od početka vjerovali u mene i omogućili mi pohađanje studija te svojom podrškom i strpljenjem uvelike olakšali ovaj period života.**

## SAŽETAK

Rod *Francisella* pripada porodici *Francisellaceae*, patogenim Gram negativnim bakterijama. Taksonomski se dijeli u pet vrsta, a najvirulentnija i najviše proučena vrsta *Francisella tularensis* uzročnik je bolesti tularemije kod ljudi i životinja. Put prijenosa uključuje posredstvo vektora od kojih je najčešći krpelj, a infekcije su zabilježene i u izravnom kontaktu s zaraženom životinjom ili inhalacijom inficiranog aerosola. *F. tularensis* je ovisno o soju široko rasprostranjena u Sjevernoj Americi, ali i u Europi i Aziji. Može se podijeliti u tri soja koja uključuju *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holartica* i *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. Zbog vrlo niske infektivne doze i lakog prenošenja zračnim putem *F. tularensis* se smatra potencijalnim biološkim oružjem te je iz tog razloga u znatnijoj mjeri istražena. Iako se donedavno smatrala sojem *F. tularensis*, danas *Francisella novicida* čini zasebnu vrstu. *F. novicida* je zbog svoje avirulentnosti kod ljudi, povoljna za proučavanje eksperimentalne tularemije pri čemu ne zahtjeva rad u laboratorijima visoke zaštitne razine. Izolirana pretežito iz slanih i boćatih voda, uspješno obitava u vakuolama unutar stanica ameba koje joj omogućuju preživljavanje u vodenom okolišu. Posjeduje i sposobnost inficiranja makrofaga u koje ulazi fagocitozom i razmnožava se unutar fagosoma. Prilikom razmnožavanja *F. novicida*, dolazi do staničnih promjena koje rezultiraju lizom i u konačnici apoptozom stanica. Naglasak ovog završnog rada stavljen je na istraživanje citopatskog učinka kojeg uzrokuje *F. novicida* kod stanica *Acanthamoeba castellanii* i imortaliziranih mišjih makrofaga. Praćena je kinetika rasta bakterije na BCYE agaru kao i količina ispuštenih staničnih proteina, DNK i enzima laktat dehidrogenaze u supernatantu, u vremenskim odmacima od 24, 48 i 72 sata nakon inficiranja. Rezultati pokazuju da se *F. novicida* bolje razmnožava i raste unutar ameba te da se tijekom porasta broja unutarstaničnih bakterija, statistički značajno više povećava i količina ispuštenih staničnih proteina, DNK i LDH, no što ih se otpusti spontano tijekom životnog ciklusa stanice. U konačnici može se zaključiti da su *A. castellanii* i imortalizirani mišji makrofagi dobar model za proučavanje unutarstaničnog načina preživljavanja i patogeneze *F. novicida* i ostalih vrsta roda *Francisella*.

**Ključne riječi:** *Francisella novicida*, *Acanthamoeba castellanii*, imortalizirani mišji makrofagi, citopatski učinak, kinetika rasta

## SUMMARY

The genus *Francisella* belongs to the family *Francisellaceae*, pathogenic Gram-negative bacteria. It is taxonomically divided into five species, and the most virulent and most studied species, *Francisella tularensis*, is the causative agent of tularemia in humans and animals. The route of transmission involves the mediation of vectors, of which the most common are ticks. Infections have also been reported in direct contact with an infected animal or by inhalation of an infected aerosol. *F. tularensis*, depending on the strain, is widespread in North America, but also in Europe and Asia. It can be divided into three strains involving *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holartica* and *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. Due to its very low infectious dose and easy airborne transmission, *F. tularensis* is considered as a potential biological weapon and has therefore been extensively researched. Although, recently considered a strain of *F. tularensis*, today *Francisella novicida* forms a separate species. *F. novicida* is due to its avirulence in humans, favorable for the study of experimental tularemia without requiring work in laboratories of high protective level. Isolated predominantly from salt and brackish waters, it successfully inhabits vacuoles within amoeba cells that allow it to survive in the water ecosystems. It also has the ability to infect macrophages, which enters by phagocytosis and multiplies within the phagosome. During the multiplication of *F. novicida*, cellular changes result in lysis and ultimately apoptosis. The aim of this work was to investigate the cytopathic effect caused by *F. novicida* in *Acanthamoeba castellanii* cells and immortalized bone marrow macrophages. The kinetics of bacterial growth on BCYE agar as well as the amount of released cellular proteins, DNA and enzyme lactate dehydrogenase in the supernatant were monitored, at intervals of 24, 48 and 72 hours post infection. The results show that *F. novicida* reproduces and grows better within amoebae. As the number of intracellular bacteria increases, the amount of released cellular proteins, DNA and LDH increases statistically significantly more than they are released spontaneously during the cell life cycle. Ultimately, it can be concluded that *A. castellanii* and immortalized bone marrow macrophages are a good model for studying the intracellular mode of survival and pathogenesis of *F. novicida* and other species of the genus *Francisella*.

**Key words:** *Francisella novicida*, *Acanthamoeba castellanii*, immortalized bone marrow macrophages, cytopathic effect, kinetic growth

# SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....	1
1.1. Rod <i>Francisella</i> .....	1
1.1.1. <i>Francisella tularensis</i> .....	2
1.1.2. <i>Francisella novicida</i> .....	3
1.2. Tularemija .....	4
1.2.1. Povijest tularemije i epidemiologija .....	4
1.2.3. Klinička slika .....	5
1.2.4. Laboratorijska dijagnostika .....	6
1.3. Interakcija <i>Francisella</i> subsp. i stanice domaćina .....	7
1.3.1. Patogeneza i virulencija <i>Francisella</i> subsp. ....	7
1.3.2. Stanični ciklus <i>Francisella</i> subsp. unutar makrofaga .....	9
1.3.3. Stanični ciklus <i>F. tularensis</i> unutar <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	11
1.4. Laboratorijska sigurnost .....	12
2. CILJ RADA .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	14
3.1. Stanične kulture .....	14
3.1.1. Uzgoj i određivanje broja <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	14
3.1.2. Uzgoj i određivanje broja imortaliziranih mišjih makrofaga .....	15
3.1.3. Bakterijski soj .....	15
3.2. Infekcija <i>A. castellanii</i> i imortaliziranih mišjih makrofaga s <i>F. novicida</i> .....	16
3.3. Kinetika rasta <i>F. novicida</i> u inficiranim stanicama .....	16
3.4. Određivanje otpuštenih staničnih proteina i DNK .....	16
3.5. Određivanje oslobođene stanične laktat dehidrogenaze .....	17
3.6. Statistička obrada rezultata .....	17
4. REZULTATI .....	18
4.1. Unutarstanični rast i razmnožavanje <i>F. novicida</i> u <i>A. castellanii</i> i imortaliziranim mišjim makrofagima .....	18
4.2. Istjecanje staničnih proteina i DNK .....	19
4.3. Oslobođena stanična laktat dehidrogenaza .....	22
5. RASPRAVA .....	25
6. ZAKLJUČAK .....	28

7. LITERATURA.....	29
8. KRATKI ŽIVOTOPIS PRISTUPNIKA.....	35



# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1. Rod *Francisella*

*Francisella* spada u porodicu *Francisellaceae* (1), patogenih Gram-negativnih kokobacilarnih bakterija veličine 0,2-0,7 µm. Taksonomski se može podijeliti u pet glavnih vrsta: *Francisella hispaniensis*, *Francisella noatunensis*, *Francisella philomiragia*, *Francisella tularensis* i *Francisella novicida* (Tablica 1) (2). Pored navedenih, rod *Francisella* obuhvaća i neke patogene riba kao što je *F. haliotica* (3), endosimbionte krpelja poput *F. persica* (4) te vrste izolirane iz boćatih voda, klimatizacijskih sustava i rashladnih tornjeva poput *F. salina* i *F. uliginis* (5). Predstavnici roda *Francisella* nastanjuju različite ekološke niše, a brz razvoj naprednih tehnologija sekvencioniranja tijekom posljednjih godina povećao je saznanja o raznolikosti ovog roda i njezinih genetskih srodnika (6).

Tijekom proučavanja prizemnih vjeverica, 1911.godine u okrugu Tular u Kaliforniji (SAD), George McCoy i Charles Chapin otkrili su bakteriju koja uzrokuje bolest nepoznate etiologije (7). Izoliranu bakteriju prozvali su *Bacterium tularensis*. Godine 1921., Edward Francis, bakteriolog Službe za javno zdrastvo SAD-a, povezo je *B. tularensis* s jelenovom mušicom i tularemijom koju je jelenova mušica prenosila sa divljih zečeva na ljude (8). Godine 1974. *B. tularensis* je preimenovana u *Francisella tularensis* u znak priznanja Dr. Francisa za doprinos u istraživanju puta prijenosa i rasta ove bakterije (9).

Prema nedavno provedenim istraživanjima, rod *Francisella* se smatra široko rasprostranjenom bakterijom koja se nalazi u različitim dijelovima prirode: u vodi, zemlji, slami, prašini itd (10). *F. novicida* i *F. philomiragia*, za razliku od *F. tularensis*, najčešće su povezane s vodenim okolišem, ali nisu povezane s vektorskim prijenosom putem člankonožaca. Genom im je jednostavniji za sekvencioniranje i rijetko su uključene u etiologiju bolesti u ljudi (11).

Bakterije iz roda *Francisella* prilagođene su na različite stanice domaćina uključujući amebe i makrofage (12). Ulaskom u amebe bakterija se nalazi u vakuolama unutar kojih se razmnožava, a nakon određenog vremena dovodi do njihove lize. Istraživanja su pokazala da je *Francisella* ameba-rezistentni mikroorganizam te se sumnja da su slobodno živuće amebe važan rezervoar ove bakterije u okolišu (13). Makrofagi su najvažnije stanice u repliciranju

*Francisella in vivo*. Međutim, u stanicama makrofaga i ostalim stanicama sisavaca, bakterija se razmnožava u citosolu, nakon bijega iz vakuole u kojoj se nalazi kratko nakon ulaska u stanicu. Također, posjeduje sposobnost repliciranja unutar fagocita, tako da se unos može promatrati kao strategija za izbjegavanje urođene obrane domaćina (14). Izvan domaćina bakterije mogu preživjeti do deset mjeseci, pri niskim temperaturama (15).

**Tablica 1. Taksonomija unutar roda *Francisella***

ROD	VRSTA	PODVRSTA	
<i>Francisella</i>	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i>	<i>holartica</i> <i>mediasiatica</i>
	<i>novicida</i>		
	<i>hispaniensis</i>		
	<i>philomiragia</i>		
	<i>noatunensis</i>	<i>noatunensis</i>	<i>orientalis</i>

### 1.1.1. *Francisella tularensis*

*Francisella tularensis* mala je gram negativna bakterija, asporogena, pleomorfna i nepokretna (16). Obligatni je aerob, a ujedno i fakultativno unutarstanični patogen koji uzrokuje bolest tularemiju kod ljudi i životinja (5). Izolirana je iz više od 250 vrsta životinja, uključujući ribe, ptice, vodozemce, kuniće, vjeverice, zečeve, voluharice i miševe, štakore, krpelje, komarce i muhe. Za *F. tularensis* utvrđeno je vrlo malo klasičnih čimbenika virulencije. Ne proizvodi egzotoksine, a lipopolisaharid tzv. LPS ne pokazuje svojstva klasičnog endotoksina. Posjeduje kapsulu koja je bitna za razvoj rezistencije u serumu, ali nije ključna za preživljavanje fagocitoze (17). Zbog vrlo niske infektivne doze i lakog prenošenja zračnim putem smatra se potencijalnim biološkim oružjem, a Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. Center for Disease Control and Prevention, CDC) klasificirao je *F. tularensis* kao biološki agens kategorije A (18).

Može se podijeliti u tri glavne podvrste, *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) koja se pojavljuje samo u Sjevernoj Americi, *F. tularensis* subsp. *holartica* (tip B) koja se javlja u Aziji i Europi te u manjoj mjeri na Sjeveru Amerike (19,20) i *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* (Tablica 1.) (21). Tip A povezan je s krpeljima i zečevima i visoko je virulentan kod ljudi, dok se tip B može naći u komarcima i glodavcima, ali je manje virulentan za čovjeka (22). Sojevi tipa A nadalje su podijeljeni u podvrste A.I i A.II na temelju geografske rasprostranjenosti,

ishoda bolesti i puteva prijenosa. Razlikuju se i po virulentnosti, pri čemu je tip A.I. najvirulentnija (23). Unatoč izraženim razlikama u njihovoj virulenciji i zemljopisnom podrijetlu, postoji više od 95–98% ukupne podudarnosti između četiri podvrste. Relativna genetska homogenost *F. tularensis* subsp. povezuje se s unutarstaničnim načinom života, s obzirom da stabilan bakterijski unutarstanični rast korelira s genomskom stabilnošću (11).

*F. tularensis* zahtjeva obogaćeni medij za rast, najčešće dodatak cisteina i animalnih bjelančevina (24). Za kultivaciju koristi se čokoladni agar s dodatkom 9 % grijanih ovčjih eritrocita (engl. CHAB- Cysteine Heart Agar Base). Nakon dva do četiri dana inkubacije pri temperaturi od 37 °C kolonije su glatke, bijele, vlažne i blago mukoidne, promjera 2-4 mm. Slabo raste na 28 °C, što se može iskoristiti za razlikovanje od *F. philomiragia* i *F. novicida* koje dobro rastu pri toj temperaturi. Optimalni pH sredine za rast je između 6,8 i 7,3. Na podlogama s dodatkom krvi oko kolonija vidljiva je uska zona alfa-hemolize. Otporna je na visoke temperature, a na -70 °C ostaje virulentna godinama (16). Prema jednom objavljenom istraživanju, tijekom produljenog razdoblja u vodi broj bakterija koje se direktno mogu uzgojiti se smanjuje na razinu ispod mogućnosti detektiranja te je na temelju metaboličke aktivnosti dokazano da je samo 30 % *F. tularensis* održivo u VBNC (engl. Viable but nonculturable) obliku u kojem je ujedno avirulentna za miševе (25).

### **1.1.2. *Francisella novicida***

Poznavanje prisutnosti *F. tularensis* u ribnjacima, rijekama i potocima na sjeverozapadu SAD-a potaknulo je kontinuirano istraživanje o raširenosti ove vrste u takvim vodama. Tijekom provedenih istraživanja otkriven je organizam izoliran iz mutnog uzorka vode koji je prikupljen iz utočišta ptica u zaljevu Ogden, u blizini Ogdena, Utah. Primljen je 12. rujna 1950. od dr. Jessupa B. iz kooperativne istraživačke jedinice za divlje životinje u Utahu (26). Izolirani organizam nazvan je *Pasteurella novicida*, navođen je i kao soj Utah 112, a kasnije se naziva *Francisella novicida* (27). *F. novicida* se dugo vremena svrstavala u podvrstu *F. tularensis*, prema istraživanjima koja su pokazala 99,6 % podudarnosti između 16S ribosomske DNA sekvence te zbog nemogućnosti razlikovanja na temelju DNA hibridizacije (28,29). Danas se *F. novicida* navodi kao zasebna vrsta roda *Francisella* na temelju fenotipskih razlika uključujući kemotaksonomske biljege potvrđene serološkim testovima iz izolata vode (26). Nadalje, svrstava se u zasebnu vrstu zbog različite uloge u okolišu, različitih kliničkih i

epidemioloških karakteristika te zbog drugačije sposobnosti i načina invazije, ali i mehanizama oštećenja tkiva kod sisavaca (27).

Zbog svoje avirulentnosti kod ljudi, povoljna je bakterija za proučavanje eksperimentalne tularemije pri čemu ne zahtjeva rad u laboratorijima visoke zaštitne razine. U miševa doza od samo 10 bakterija uzrokuje tularemiju s istim simptomima bolesti kao podvrsta *tularensis* (30). Iako avirulentna za ljude bez zdravstvenih problema, dokazano je da može uzrokovati bolest kod imunokompromitiranog domaćina pa se smatra oportunističkim patogenom (29). Takve bolesti ne nalikuju tularemiji i javljaju se iznimno rijetko pa ih je teško ispravno dijagnosticirati (31). Za razliku od *F. tularensis*, identifikacija *F. novicida* nikada nije zabilježena kod divljih životinja ili člankonožaca, što ukazuje da po svojoj prirodi *F. novicida* nije zoonoza (32). Osim slane vode *F. novicida* izolirana je i u bočatoj vodi (33).

## 1.2. Tularemija

Tularemija je zoonoza, odnosno rijetka bakterijska infekcija koju uzrokuje *Francisella tularensis* s izuzetno niskom dozom tj. s manje od 10 bakterija koje mogu izazvati teški oblik bolesti kod ljudi i životinja (34). Bolest može imati kobni ishod, a osobito kada je uzročnik *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Mnogi slučajevi bolesti uzrokovani sojevima slabije virulencije nisu dijagnosticirani (35). Ljudi se mogu zaraziti s *F. tularensis* u kontaktu s tkivom zaražene ili mrtve životinje, ingestijom nedovoljno termički obrađenog mesa ili u kontaktu s kontaminiranom vodom te putem vektora, najčešće izmetom krpelja (36). Put prijenosa također uključuje prijenos zrakom, ali i aerosolom. Rizične osobe uključuju ljude koji borave u prirodi i u kontaktu su s krpeljima i životinjama poput šumara, lovaca, poljoprivrednika i vrtlara. Ova bolest se ne prenosi s osobe na osobu, a češće se javlja u ruralnim područjima (24).

### 1.2.1. Povijest tularemije i epidemiologija

Prvi put je primijećeno izbijanje bolesti nalik kugi kod glodavaca 1911. godine u okrugu Tular u Kaliforniji (7,37). Nakon toga, zabilježen je niz infekcija s *F. tularensis* kod kralježnjaka, uključujući sisavce, ptice, vodozemce i ribe, ali i kod beskralježnjaka. Ovaj sindrom nazivao se još i zečja groznica, bolest jelenje mušice i Francisova bolest (38). Do 1925.

godine uvriježeno je bilo mišljenje da je rizik za obolijevanje od tularemije ograničen na SAD (39). Ta se percepcija ubrzo promijenila kada je Ohara, proučavajući bolest zečeva u Japanu, prepoznao sličnost bolesti s tularemijom i poslao uzorke Edwardu Francisu, koji je potvrdio prisustvo *F. tularensis* (40).

U bivšem Sovjetskom savezu (1928.) *F. tularensis* je prepoznat kao uzročnik "bolesti lovaca", odnosno bolesti koju su lovci stekli tijekom skidanja kože životinjama za izradu krzna, a također se povezuje i s kućnim miševima i voluharicama (39,41). Ubrzo nakon toga, tularemija je zabilježena i u Norveškoj (1929.), Kanadi (1930.), Švedskoj (1931.) i Austriji (1935.) (39). Nedavno su zabilježeni slučajevi tularemije na području Turske, Španjolske, Kosova i Švicarske što ukazuje da je ova bolest još rasprostranjenija nego što se prije mislilo. Tularemija nije bolest koja se prijavljuje Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji pa time učestalost njezine pojave nije uvelike zabilježena. (24).

Iz različitih zemalja bilježe se različiti „ciklusi“ tularemije, ovisno o podvrsti bakterije, rezervoaru i načinima prijenosa, odnosno vektoru (41). U Sjevernoj Americi identificirana su dva glavna epidemiološka sustava - krpeljom izazvana tularemija u kunića i tularemija pravih glodavaca koja se prenosi vodom (42). *F. tularensis* se kod 90% slučajeva tularemije u ljudi u SAD-u prenosi krpeljima. U najmanje 70% tih slučajeva izvor zaraze s *F. tularensis* subsp. *tularensis* predstavljaju kunići. Tularemija pravih glodavaca, koja utječe i na druge životinje, a prenosi se vodom, izvor je 5-10% infekcija ljudi u Sjevernoj Americi, a uzrokovana je s *F. tularensis* subsp. *holarctica* (43). U srednjoj Europi kao vektori tularemije zabilježeni su *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes ricinus*. U područjima Češke i Austrije u kojima se javljaju prirodna žarišta tularemije, između 2,1% i 2,8% analiziranih krpelja *D. reticulatus* sadržavalo je *F. tularensis* (44). Na području bivšeg Sovjetskog saveza *F. tularensis* prenose i komarci vrsta *Aedes*, *Culex* i *Anopheles* te vrste krpelja *Ixodes* (41).

### 1.2.3. Klinička slika

Simptomi tularemije pojavljuju se u prosjeku jedan do četrnaest dana nakon infekcije, ali inkubacija najčešće traje dva do pet dana. Bakterije mogu inficirati ljudsko tijelo putem kože i konjunktiva, sluznice, usne šupljine i ždrijela (34). Nakon uspješne infekcije, *F. tularensis* se razmnožava na početnom mjestu infekcije, a zatim se širi na regionalne limfne čvorove, jetru i slezenu, iz kojih dalje može cirkulirati cijelim sustavom. Poznato je šest kliničkih sindroma koji se javljaju pri razvoju tularemije od kojih je najtipičniji ulceloglandularni sindrom s pojavom

kožnih lezija na mjestu infekcije (40). U slučaju prodora bakterije u krv dolazi do tifoidnog oblika bolesti s razvojem septikemije. Također se mogu razviti i glandularni, okuloglandularni, orofaringealni i plućni sindrom. Orofaringealna tularemija rezultat je ingestije kontaminirane hrane i vode. Primarni čir lokaliziran je u ustima, a limfni čvorovi regije vrata su povećani. Plućni oblik tularemije nastaje nakon udisanja kontaminirane prašine i često je povezana s poljoprivrednim aktivnostima ili uređenjem okoliša. Pneumonija nije uvijek prisutna tijekom plućnog oblika, ali može biti prisutna u drugim oblicima tularemije (45). Klinički početak bolesti uključuje iznenadnu temperaturu, zimicu, glavobolju, proljev, bolove u mišićima i zglobovima, suhi kašalj i progresivnu slabost, a zatim se razvijaju čirevi na koži ili ustima, natečene i bolne limfne žlijezde, natečene i bolne oči te grlobolja. Ako se razvije upala pluća, osoba može razviti bol u prsima, jak kašalj i poteškoće s disanjem (34). Bez liječenja, klinički tijek napreduje do zatajenja disanja, šoka i smrti. Liječenje se odvija streptomycinom, gentamicinom, doksiciklinom ili ciprofloksacinom., a profilaktička primjena doksiciklina ili ciprofloksacina može biti korisna u ranom razdoblju ekspozicije (46).

#### **1.2.4. Laboratorijska dijagnostika**

*F. tularensis* se može izolirati iz limfnih čvorova, ispljuvka ili strugotina ulkusa. Mikroorganizam se rijetko kultivira izravno iz krvi, iako je to izvedivo razvojem senzitivnih sustava pretrage krvne kulture. Istraživanja na tu temu pokazuju da se uzročnik može izolirati iz krvi kod pacijenata s isključivo težim oblikom tularemije (47). Pri plućnoj tularemiji organizam se može izolirati ispiranjem ždrijela i u pleuralnoj tekućini. Zbog izrazite virulencije i poteškoća kultiviranja, dijagnoza tularemije postavlja se serološkim pretragama i prema kliničkoj slici. Serološkim testovima se ujedno i smanjuje rizik od inficiranja laboratorijskog osoblja pri radu s agensom. Dijagnoza humane bolesti utvrđuje se pozitivnim nalazom antitijela na *F. tularensis* koja se javljaju dva tjedna nakon početka bolesti. Također se za dijagnostiku koristi i lančana reakcija polimerazom, odnosno PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*). Detekcija serumskih antitijela najčešće se postiže aglutinacijom ili primjenom ELISA (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) testa (48).

### 1.3. Interakcija *Francisella* subsp. i stanice domaćina

Intracelularni patogeni slijede jedan od tri opća puta unutar stanice domaćina. Prvi je ekstrasfagosomalni put u kojem patogen lizira fagosomsku membranu i slobodno boravi u citoplazmi stanica domaćina. Zatim postoji fagolizosomalni put pri kojem patogen boravi i umnožava se u zakiseljenom fagosomu koji se stapa s lizosomima i na posljeticu fagosomski put, gdje patogen boravi u fagosomu koji se ne stapa s lizosomima (49). Nepatogene bakterije pri inficiranju stanica bivaju preuzete u vakuole ili fagosome koji se prerađuju endocitnim putem tijekom kojeg vakuole sazrijevaju u lizosome u kojima dolazi do razgradnje bakterija. Prvi dokazi da *F. tularensis* posjeduje mogućnost replikacije u *in vitro* uvjetima potječu iz ispitivanja zaraženih zametaka pilića, a rezultati pokazuju da su bakterije prisutne u citoplazmi zaraženih stanica (50).

U okviru ovog završnog rada naglasak je stavljen na makrofage i amebe kao potencijalne stanice domaćina. U sljedećim poglavljima detaljnije su opisani čimbenici koji omogućuju virulenciju te način na koji *Francisella* održava unutarstanični rast i uzrokuje citopatski učinak.

#### 1.3.1. Patogeneza i virulencija *Francisella* subsp.

*F. tularensis* posjeduje nekoliko čimbenika virulencije, od kojih su mnogi izraženi kao komponente tzv. *Francisella* patogenog otoka, FPO (engl. *Francisella pathogenicity island*, FPI). Ovi bakterijski produkti povećavaju virulenciju mikroorganizma kroz nekoliko mehanizama, uključujući suzbijanje imunološkog odgovora domaćina i olakšavanje „fagosomskog bijega“ i unutarstanični opstanak (51). Prvi put opisan 2004. godine, FPO sadrži 19 gena različitih veličina, uključujući *iglABCD* i *pdpABCD*, za koje se pokazalo da su ključni za virulenciju (52). *F. novicida* koja posjeduje smanjenu virulenciju, sadrži samo jedan primjerak FPO, dok virulentnije podvrste *tularensis* i *holarctica* posjeduju dvije kopije. U istraživanju koje je opisalo FPO, gen *pdpA* opisan je kao bitan gen za virulenciju, ali njegova funkcija i funkcije ostalih *pdp* gena nisu u potpunosti poznate. Otkriveno je također da je gen *pdpD* prisutan u *F. novicida* i *F. tularensis* tipa A, ali ne i u podvrstama tipa B te je uključen u preživljavanje unutar makrofaga. FPO također kodira sustav sekrecije bjelančevina u citosol

stanice domaćina koji je povezan s nedavno otkrivenim tzv. tipom IV sustavom pila koji ujedno omogućuje bakteriji adherenciju na stanice domaćina (53).

Između ostalog, ključnim za unutarstanični rast *F. tularensis* pokazala se prisutnost željeza. Znanstvenici su otkrili da koncentracija željeza u mediju može utjecati na ekspresiju FPO te da *F. tularensis* aktivno modulira ekspresiju receptora za transferin u cilju promicanja isporuke željeza fagosomu u ranim fazama unutarstaničnog rasta (54,55). S druge strane iskorištavanje željeza može učiniti bakteriju osjetljivijom na eliminaciju putem reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Nadalje, utvrđeno je da mutirani visoko virulentni soj Tipa A, Schu S4 ima niži sadržaj željeza od avirulentnog soja LVS što se smatra razlogom za smanjenu virulenciju LVS soja (56). Također, kontrola reaktivnih kisikovih spojeva i dušikovih spojeva je potvrđeno bitan čimbenik virulencije *Francisella* (57).

*Francisella* subsp. posjeduje niz proteina koji joj omogućavaju unutarstanično održavanje. Primjerice, protein AcpA ima funkciju kisele fosfataze, a gubitak funkcije tog proteina kod *F. novicida* rezultirao je proizvodnjom ROS-a i narušavanju unutarstaničnog preživljavanja u humanim neutrofilima i MDM (engl. *Monocyte Derived Macrophages*). Nadalje, protein matriksa metaloprotein 9 se oslobađa iz neutrofila i aktiviranih makrofaga, a ima važnu ulogu u nakupljanju leukocita. Miševi s mutacijom u genu koji regulira proizvodnju metaloproteina bili su u stanju izbjeći infekciju, čak i s visoko virulentnim podvrstama *F. tularensis*, dok je normalna ekspresija učinila miševe osjetljivijim na infekcije (58). O antigen *F. novicida* ključan je za rezistenciju u serumu, ali manje važan za unutarstanično preživljavanje, negoli je to slučaj kod *F. tularensis* (59).

Kod nekih ispitivanja na životinjama primijećena je proizvodnja dušikovog monoksida (NO) od strane makrofaga radi ograničavanja infekcije unutarstaničnim bakterijskim patogenima. Zbog varijacije LPS-a, za razliku od ostalih gram negativnih bakterija, *F. tularensis* ne uzrokuje protuupalno djelovanje, a što čini se utječe na indukciju NO i moduliranja urođenog imunološkog odgovora (60).

Infekcija s *F. tularensis* povezana je s izraženim upalnim odgovorom karakteriziranim proizvodnjom nekoliko citokina, međutim komponente bakterije koje izazivaju upalu i dalje nisu dovoljno istražene (61). Općenito, IFN- $\gamma$  (engl. *Interferon gamma*) spada u skupinu citokina koja ima značajnu ulogu u razvoju urođenog i adaptivnog imuniteta protiv



unutarstaničnih bakterijskih infekcija (62). Nadalje, stanice domaćina koriste nekoliko vrsta receptora za prepoznavanje obrazaca u otkrivanju mikrobnih proizvoda koji potječu od bakterija, virusa, kvasaca i protozoa. TLR skupina receptora (engl. *Toll-Like Receptors*) izražena je na površini stanica domaćina ili u endosomima. Zbog nemogućnosti indukcije upalne reakcije LPS-om smatra se da su lipoproteini kod *F.tularensis* odgovorni za signalizaciju TLR-2 i pokretanje urođenog imunološkog odgovora (61).

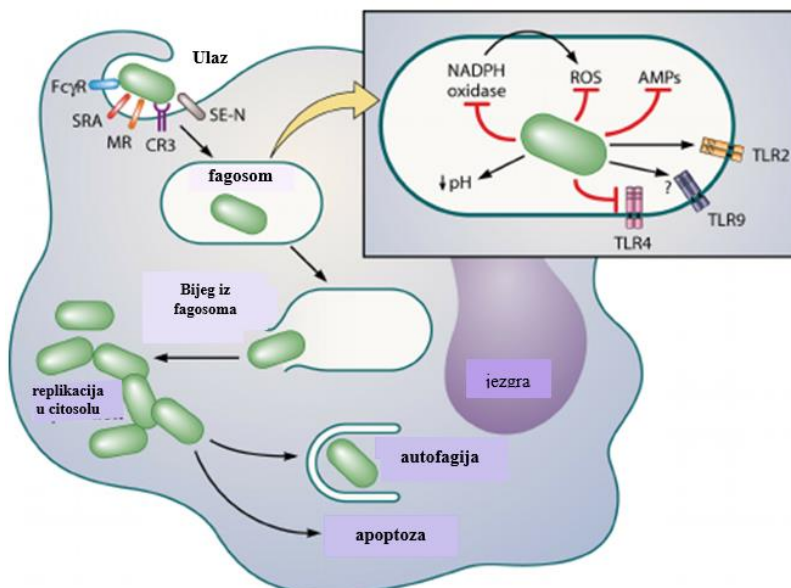
### 1.3.2. Stanični ciklus *Francisella* subsp. unutar makrofaga

Makrofagi su najbrojnija stanična populacija mononuklearno-fagocitnog sustava i prisutni su u svakom organu i tkivu. Razlikuju se morfološki, biokemijski i funkcionalno, od prekursora u cirkulaciji, monocita, s obzirom na tkivo te unutar istih tkiva (63). Makrofagi imaju središnju ulogu u obrani domaćina od infekcije efektom uništavanja mikroorganizama i kontrolom upalnih reakcija domaćina. Kada ispunjavaju ove funkcije, makrofagi se kontroliraju postupcima koji reguliraju proliferaciju stanica i apoptozu odnosno staničnu smrt stanice (64). Sve je više dokaza da mikroorganizmi mogu reguliranjem apoptoze utjecati na preživljavanje makrofaga ili drugih stanica domaćina. Ranija istraživanja opisuju *F. tularensis* kao obligatnog unutarstaničnog patogena makrofaga u *in vivo* uvjetima prema dokazima o umnažanju bakterije u mišjim makrofagima, jetrenim stanicama zamorca i endotelnim stanicama crijeva izoliranim iz krpelja (65,66).

*F. tularensis* ulazi u makrofage vezujući se na receptore na njihovoj površini (slika 1.), a izbjegavajući Citokalasin D, inhibitora polimerizacije aktina koji sprječava više od 99,9% unosa ove bakterije. Nakon ulaska mikroorganizma fagocitozom u makrofage, ustanovljeno je da *F. tularensis* u početku boravi u fagosomu (vezikuli nastaloj nakon fagocitoze određene čestice). Potom, bakterija zaustavlja sazrijevanje fagosoma (engl. *F. tularensis* containing-phagosome, FCP), koji stječe markere ranih i kasnih endosoma te inhibira zakiseljavanje FCP što je neophodno za rast bakterije i iskorištavanje željeza (54). Jedinstvena značajka fagosoma je ta što je često obavijen gustim vlaknastim omotačem. S protekom 30-60 minuta nakon infekcije, fagosomska membrana postaje razorena što omogućava da se bakterija slobodno razmnožava u citoplazmi makrofaga. Izlaskom u citoplazmu dolazi do inficiranja okolnih stanica koje u konačnici podliježu procesu apoptoze (Slika 1.) (67). Postoje dokazi da nekoliko FPO proteina, uključujući protein IgIC, inhibira sazrijevanje fagosoma te time olakšava unutarstanično preživljavanje i replikaciju (68).

S druge strane, dokazano je da opsonizirani mikroorganizam (ovijen antitijelima na površini) biva aktivno fagocitiran polimorfonuklearnim leukocitima koji su sposobni uništiti bakterije pomoću oksidativnih mehanizama (69). Stimulacija IFN- $\gamma$  i TLR-2 može dovesti do izlučivanja upalnih citokina i kemoatraktanata te time spriječiti replikaciju unutar makrofaga (62).

Većina istraživanja (70,71) je provedena na atenuiranom LVS (engl. Live Vaccine Strain) soju *F. tularensis*, dok je malo toga poznato o interakciji virulentnog soja *F. tularensis* subsp. *tularensis* i *F. novicida* s makrofagima. Istraživanje je pokazalo da virulentni klinički izolat *F. tularensis* subsp. *tularensis* kao i atenuirani LVS soj prolazno borave u nezakiseljenom fagosomu. Također, postoje dokazi o tome da nakon bijega LVS soja u citoplazmu, udio citoplazmatskih bakterija ponovno ulazi u endocitni put kroz autofagiju (Slika 1.) (67). Prethodna istraživanja s mutantima LVS i Schu S4 koji se ne uspijevaju replicirati unutar primarnih makrofaga, ne uspijevaju niti inficirati miševe intranazalno (72).

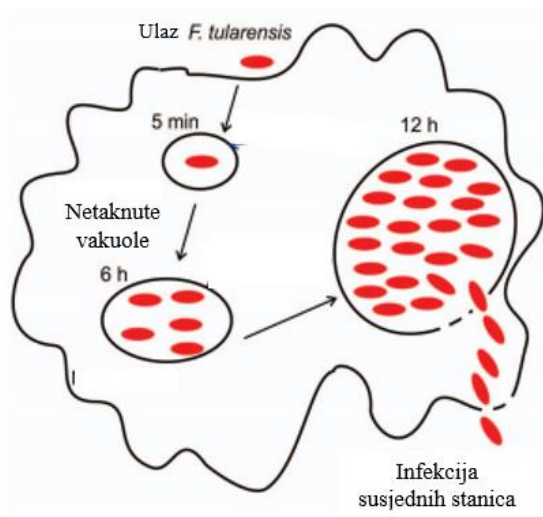


**Slika 1. Stadiji patogeneze *F. tularensis* unutar makrofaga.** Izvor: Jones, Crystal & Napier, Brooke & Sampson, Timothy & Llewellyn, Anna & Schroeder, Max & Weiss, David. *Subversion of Host Recognition and Defense Systems by Francisella spp.* Microbiology and molecular biology reviews; 2012: MMBR. 76. 383-404. 10.1128/MMBR.05027-11.

### 1.3.3 Stanični ciklus *F. tularensis* unutar *Acanthamoeba castellanii*

Slobodno živuće amebe su skupina ubikvitarnih jednostaničnih organizama sa sposobnošću rasta u prirodnom okruženju kao što je to voda, tlo i prašina, ali su često izolirane i iz antropogenih ekosustava poput klimatizacijskih uređaja i rashladnih tornjeva gdje se pretežno hrane mikrobnim biofilmom (73). U odgovarajućim uvjetima mogu biti patogene za ljude i životinje. Široko su rasprostranjene preko cijele hemisfere, a mogu se nalaziti u obliku trofozoita i ciste. Rod *Acanthamoeba* je najrasprostranjenija slobodno živuća ameba u usporedbi s *Naegleria spp.*, *Balamuthia spp.*, *Sappinia spp.*, *Valkampfia spp.* itd. Amebe kontroliraju rast mikrobne populacije na način da se hrane bakterijama i gljivama. Neki mikroorganizmi razvili su različite mehanizme kojima izbjegavaju razgradnju unutar stanica ameba te se nazivaju „ameba-rezistentni mikroorganizmi” (74).

*Francisella* subsp. obitava u endosimbiozi sa slobodno živućim amebama koje eventualno može koristiti kao vektore u načinu širenja. Proces inficiranja ameba pokazuje sličnosti s načinom inficiranja makrofaga (73). Po ulasku u stanice ameba, bakterija se nalazi i replicira unutar vakuola vezanih membranom odnosno unutar vakuola koje sadrže *Francisellu* (engl. *Francisella*-containing vacuoles, FCVs). S obzirom da FCVs posjeduju osobine autolizosoma, *Francisella* unutar vakuole nailazi na lizosomsko okruženje, ali nisu primijećeni znakovi razgradnje bakterija kod većine FCVs, što sugerira da *Francisella* može spriječiti fagolizomalna baktericidna stanja ponovnim ulaskom u endocitni put. Uloga vakuola u unutarstaničnom ciklusu i patogenezi *Francisella* nije zasad u potpunosti istražena, ali dosadašnja istraživanja tvrde da formiranje FCVs ne utječe na opstanak i replikaciju unutar stanica, što sugerira da vakuole nisu uključene u proliferaciju bakterija (75). Pored toga, nakon lize stanica *A. castellanii*, bakterija izlazi u medij gdje ima dovoljne količine hranjivih tvari za rast i replikaciju i na taj način inficira okolne stanice (Slika 2.) (76). Dosadašnja ispitivanja su pokazala da rast *F. tularensis* u *A. castellanii* rezultira ranim promjenama ameba, poput nestanka jezgre i kondenzacije citoplazme. Također dolazi do izmjene staničnih organela, poput mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma (77). Do sada je utvrđeno da je iglD gen, koji je dio *Francisella* patogenog otoka, bitan za rast i razmnožavanje *F. novicida* u stanicama *A. castellanii* (78). Također, istraživanja su pokazala da za razliku od stanica sisavaca bakterija se razmnožava u vakuoli, dok se u stanicama sisavaca razmnožava u citosolu (76).



**Slika 2. Unutarstanični život *F. tularensis* unutar slobodno živućih ameba.** Izvor: Ožanić M, Marečić V, Gobin I, Šantić M. *Intracellular life of Francisella and Legionella within amoebae cells. Medicina Fluminensis [Internet]. 2016 [pristupljeno 30.04.2020.];52(1):49-54.*

#### 1.4. Laboratorijska sigurnost

Istraživanja koja se provode s bakterijom *F. tularensis* subsp. *tularensis* odvijaju se u laboratorijima s trećim stupnjem zaštite tzv. BSL-3 laboratorijima. Zbog izuzetne virulencije, mogućnosti inficiranja respiratornim putem, osoblje tijekom rada mora biti zaštićeno posebnom zaštitnom opremom (79). Većina istraživanja patogeneze i virulencije *F. tularensis* koristi atenuirani LVS soj *F. tularensis* subsp. *holartica* i *F. novicida* soj U112 iz razloga što su oba soja avirulentna za ljude te su zbog toga izuzeti iz propisa o biološkoj sigurnosti. Tako je, iz sigurnosnih razloga i u ovom završnom radu korištena vrsta *F. novicida*. Tijekom laboratorijskog rada s vrstama roda *Acanthamoeba* subsp. potrebno je izbjegavati kontakt s očima s obzirom da mikroorganizam uzrokuje keratitis koji može dovesti do sljepoće. Najčešće zahvaća kontaktne leće pa su osobe koje ih nose u povećanom riziku, iako se bolest može manifestirati i kod osoba koje nemaju leće. Osobama koje nose kontaktne leće nije preporučljiv rad u laboratoriju s *Acanthamoeba* subsp. (80).

## 2. CILJ RADA

Cilj ovog završnog rada bio je ispitati citopatski učinak bakterije *F. novicida* na stanice makrofaga i *Acanthamoeba castellanii* prateći kinetiku rasta *F. novicida* unutar stanica domaćina 24, 48 i 72 sata nakon inokulacije. Također, usporedbom podataka dobivenih iz mjerenja količine istjecanja staničnih proteina, DNK i enzima LDH prije inficiranja i nakon lize stanica inficiranih ovom bakterijom, nastoje se utvrditi sličnosti i razlike između stanice sisavaca i ameba.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Stanične kulture

U eksperimentu su korištene stanične linije *Acanthamoeba castellanii*, imortalizirani mišji makrofagi iz koštane srži koji eksprimiraju GFP-LC3 (iBMM GFP-LC3) te bakterijski soj *Francisella novicida* U112. Prije infekcije, stanice ameba i makrofaga su uzgojene u zasebnim medijima i u određenim uvjetima inkubacije, a bakterijski soj je nasađen na hranjivu podlogu te je potom priređena suspenzija odgovarajuće optičke gustoće.

#### 3.1.1. Uzgoj i određivanje broja *Acanthamoeba castellanii*

*A. castellanii* uzgojena je u ATCC (engl. American Type Culture Collection) 30234 mediju koji u svom sastavu sadrži proteine, kvasce i minerale. U bočice za uzgoj (engl. flask) volumena 75 ml stavljeno je 20-30 ml sterilnog medija temperiranog na sobnu temperaturu u kojeg su dodane amebe te su bočice potom inkubirane na 25 °C tijekom 24 sata da bi se amebe adherirale na površinu. Nakon inkubacije amebe su ostrugane s površine bočice, a medij je zamijenjen s ATCC 1323 medijem koji ne sadrži proteine i kvasce, kako bi amebe imale što više hranjivih tvari, a da bi se ujedno smanjilo pretjerano izvanstanično razmnožavanje bakterija. Zatim je 1 ml medija s amebama prenesen u mikrotitar pločicu s 24 jažica, koje su inkubirane na 25 °C tijekom 24 sata s ciljem da amebe adheriraju na dno jažica. Za potrebe pokusa korišteno je  $1 \times 10^5$  ameba/ml, a njihov broj određen je u Neubauer komorici svjetlosnim mikroskopom.

Sastav ATCC 30234 medija (1 L):

- 20 g proteinskog peptona
- 1,0 g kvašćevog ekstrakta
- 20,0 g agara
- 1000 ml destilirane vode

Sastav ATCC 1323 medija (500 ml):

- 0,142 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 0,136 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 500,0 ml destilirane vode

### 3.1.2. Uzgoj i određivanje broja imortaliziranih mišjih makrofaga

Imortalizirani mišji makrofagi (engl. Immortalized bone marrow macrophages, iBMM) iz koštane srži uzgajani su u DMEM mediju koji sadrži 1g/L glukoze (Lonza, SAD) te je nakon prve pasaže stanica dodan antibiotik G418. U bočici za uzgoj prije infekcije medij je zamijenjen s medijem bez glukoze kako bi se spriječio izvanstanični rast bakterija. Stanice su ostrugane s površine bočice te je 1 ml medija s makrofagima prenesen u mikrotitar pločicu s 24 jažica koja je potom inkubirana na 37 °C tijekom 24 sata u uvjetima s 10% CO<sub>2</sub>. U pokusu je korišteno 1x10<sup>5</sup> stanica/ml, a njihov broj je određen u Neubauer komorici svjetlosnim mikroskopom.

### 3.1.3. Bakterijski soj

*F. novicida* U112 prethodno je nasadena na BCYE agar (engl. Buffered Charcoal Yeast Extract Agar) koji je inkubiran na 37 °C tijekom 24 sata. Bakterija na ovoj podlozi raste u obliku sitnih prozirnih kolonija. Kolonije *F. novicida* umućene su u 3 ml sterilne fiziološke otopine u cilju pripreme bakterijske suspenzije. Dobivena bakterijska suspenzija homogenizirana je na tresilici te je 500 µl preneseno u kivetu, a broj bakterija je određen spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 600 nm. Pripremljena suspenzija je korigirana sve dok nije postignuta optička gustoća uzorka OD=1. Prethodno je izrađena krivulja rasta kojom je definirano da suspenzija apsorbancije OD=1 sadrži 10<sup>9</sup> bakterija/ml. U ovom radu korišteno je 10<sup>7</sup> bakterija/ml.

Sastav BCYE agara:

- 10 g kvašćevog ekstrakta
- 2 g aktivnog ugljena
- 20 g agara
- 10 g ACES pufera
- 1 g α- ketoglutarata
- 900 ml sterilne destilirane vode
- 10 ml Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
- 10 ml L- cisteina

### **3.2. Infekcija *A. castellanii* i imortaliziranih mišjih makrofaga s *F. novicida***

U ovom radu  $10^5$  stanica/ml inficirano je s  $10^7$  bakterija/ml odnosno dobivena je vrijednost MOI (engl. Multiplicity of infection) 100. Na svaku amebu, odnosno stanicu makrofaga dodano je 100 bakterija *F. novicida*. Nakon infekcije mikrotitar pločice su se centrifugirale kako bi se bakterijske stanice sedimentirale na dno čime se ubrzava sam postupak infekcije. Mikrotitar pločice se inkubiraju tijekom jednog sata na 37 °C uz 10% CO<sub>2</sub> za makrofage i 25 °C za amebe.

### **3.3. Kinetika rasta *F. novicida* u inficiranim stanicama**

Određivana je kinetika rasta i razmnožavanja *F. novicida* u amebama i makrofagima 24, 48 i 72 sata nakon infekcije. Stanice su tretirane 1%-tnim saponinom koji je prethodno filtriran te su potom uzorci ostavljeni 5 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se razorila membrana i odredio broj unutarstaničnih bakterija. Iz svake jažice nasadeno je 10 µl suspenzije na BCYE agar koji je inkubiran na 37 °C. Postupak je ponavljan sljedeća dva dana te je praćeno kako se protekom vremena mijenja broj *F. novicida* u inficiranim stanicama izražen kao CFU/ml (engl. Colony Forming Units).

### **3.4. Određivanje otpuštenih staničnih proteina i DNK**

*F. novicida* se razmnožava unutar stanica ameba i makrofaga što uzrokuje oštećenje stanične membrane i lizu stanice domaćina. Prilikom raspadanja stanice proteini i DNK izlaze u izvanstanični medij odnosno supernatant. Zbog velikog broja bakterija izvan samih stanica potrebno je supernatant centrifugirati tijekom dvije minute na 4000 rpm (engl. rounds per minute) kako bi se bakterije istaložile, dok u supernatantu ostaju samo proteini, DNK i laktat dehidrogenaza (LDH). Medij u kojem su stanice ameba i makrofaga uzgojene služio je kao slijepa proba. Prethodno samom mjerenju apsorbancije uzorka izmjerena je apsorbancija istog volumena slijepa probe. Volumen od 450 µl supernatanta stavljen je u kivete te je količina otpuštenih proteina i DNK određena spektrofotometrijski na valnoj duljini od 280 nm.



### 3.5. Određivanje oslobođene stanične laktat dehidrogenaze

Iz oštećenih stanica dolazi do oslobađanja enzima laktat dehidrogenaze. Nakon 24, 48 i 72 sata od infekcije 50  $\mu$ l supernatanta je prebačeno u mikrotitar pločicu s 96 jažica i ravnim dnom. Tijekom prikupljanja supernatanta kroz tri dana pločica je čuvana na temperaturi od 4 °C. Stanična laktat dehidrogenaza određena je pomoću kita „CytoTox 96 ® Non-Radio. Cytotoxicity Assay“ prema uputama proizvođača (Promega Corporation) (81). Mješavina supstrata (engl. substrate mix) koja sadrži laktat je otopljena u 12 ml pufera te je potom u mikrotitar pločicu dodano 50  $\mu$ l pripremljene otopine i uzorci su inkubirani tijekom 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon toga u jažice je dodano 50  $\mu$ l otopine za zaustavljanje reakcije. Laktat je putem enzima laktat dehidrogenaze pretvoren u piruvat koji reagira sa formazanom i nastaje crveno obojenje. Apsorbancija je očitana na valnoj duljini od 492 nm na uređaju „Micro Plate Reader“. Dobivena optička gustoća aproksimativno pokazuje količinu oslobođenog LDH iz stanice.

### 3.6. Statistička obrada rezultata

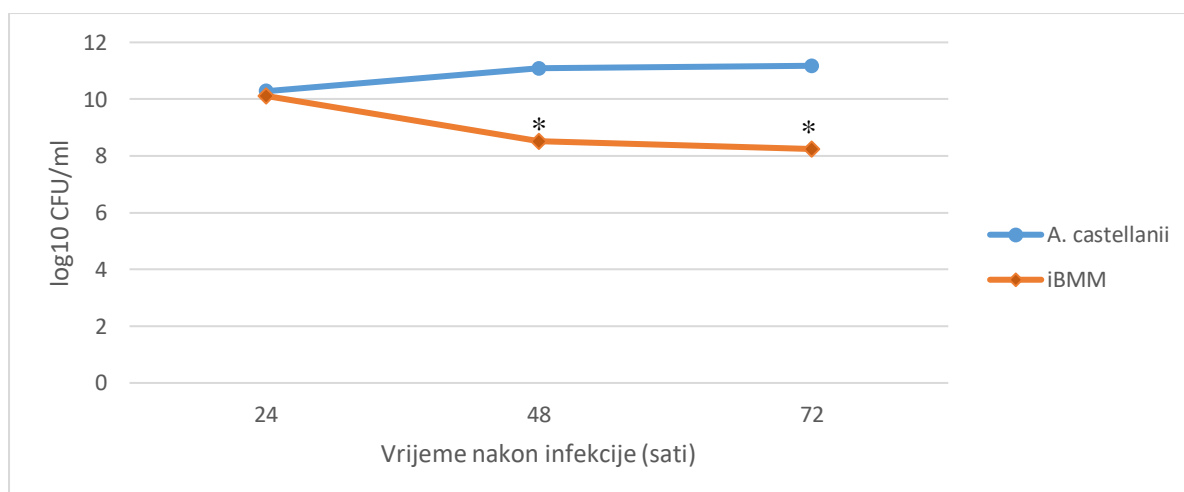
Rezultati dobiveni eksperimentalnim radom obrađeni su programom Microsoft® Office Excel. Svi podaci prikazani su grafički, a dobiveni broj kolonija (CFU/ml) pretvoren je u logaritamski izraz s bazom 10. ( $\log_{10}$  CFU/ml) kao nezavisna varijabla za izradu grafikona kinetike rasta *F. novicida* u inficiranim stanicama. Rezultatima za kinetiku rasta *F. novicida* u amebama i makrofagima izračunata je statistička značajnost t-testom u programu GraphPad Prism. Također je statistička značajnost određena i za rezultate oslobođenih staničnih proteina, DNK i LDH između inficiranih i neinficiranih stanica ameba i makrofaga. Vrijednostima dobivenim za oslobođenu laktat dehidrogenazu izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Unutarstanični rast i razmnožavanje *F. novicida* u *A. castellanii* i imortaliziranim mišjim makrofagima

Broj kolonija u *A. castellanii* nakon 24 sata od infekcije na BCYE agaru iznosio je  $1,9 \times 10^{10}$  CFU/ml (Slika 3.). Nakon 48 sati od infekcije broj *F. novicida* narastao je na  $1,2 \times 10^{11}$  CFU/ml (Slika 3.), a 72 sata nakon infekcije broj *F. novicida* iznosio je  $1,5 \times 10^{11}$  CFU/ml (Slika 3.).

Broj unutarstaničnih bakterija *F. novicida* u imortaliziranim makrofagima nakon 24 sata od infekcije iznosio je  $1,3 \times 10^{10}$  CFU/ml (Slika 3.). Nakon 48 sati od infekcije broj bakterija smanjio se na  $3,25 \times 10^8$  CFU/ml (Slika 3.). Protekom 72 sata broj unutarstaničnih *F. novicida* iznosio je  $1,75 \times 10^8$  CFU/ml (Slika 3.).



**Slika 3. Usporedba kinetike rasta *F. novicida* U112 unutar *A. castellanii* i imortaliziranih mišjih makrofaga.** BCYE agar inkubiran je na 37 °C, a broj bakterija unutar stanica je praćen uzastopno tijekom tri dana. \*Rezultati prikazuju statistički značajnu razliku između kinetike rasta ameba i makrofaga koja je određena t-testom. Razina od  $p < 0,05$  smatrana je statistički značajnom.

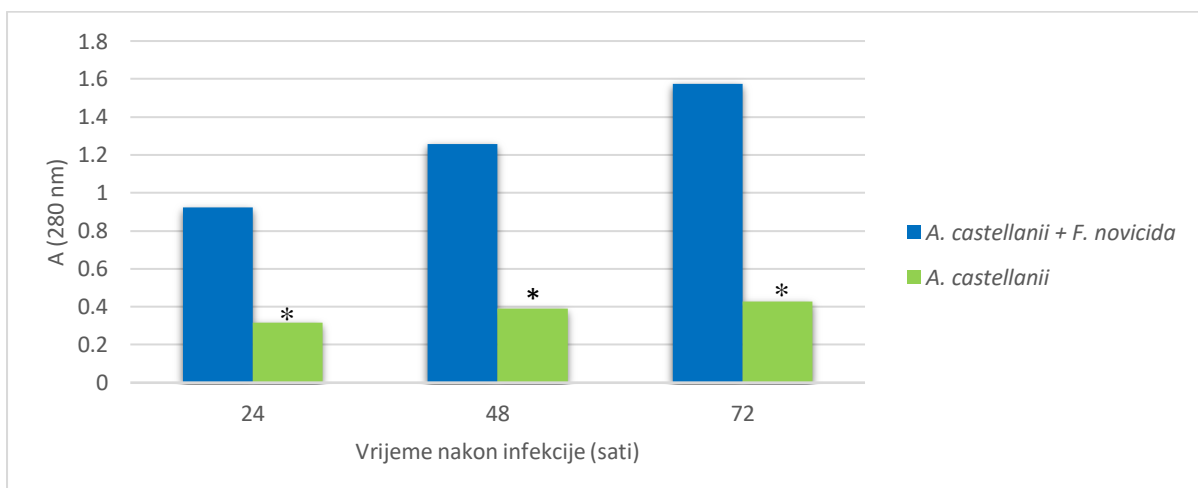
Iz priloženih rezultata vidljivo je da se početni broj bakterija u staničnim uvjetima unutar *A. castellanii* tijekom 48 sati povećava dok nakon 72 sata od inokulacije u odnosu na dan ranije praktički stagnira (Slika 3). S druge strane, vremenom se broj unutarstaničnih *F. novicida* unutar imortaliziranih makrofaga smanjuje. Nakon prvih 24 sata bilježi se porast broja inokuliranih bakterija, dok nakon 48 sati broj pada. Po isteku 72 sata od infekcije broj bakterija

se smanjio u odnosu na prethodni dan, ali neznatno (Slika 3). U konačnici vidljivo je da se unutarstanični rast kod *A. castellanii* održava tijekom promatranja konstantno u laganom porastu dok kod makrofaga dolazi do značajnog smanjenja broja unutarstaničnih *F. novicida*. U konačnici, vidljivo je da se *F. novicida* bolje razmnožava u stanicama ameba nego li u makrofagima te je broj bakterija statistički značajno veći u amebama nakon 48 sati ( $p=0,0001$ ) i nakon 72 sata ( $p=0,0001$ ) u odnosu na makrofage.

## 4.2. Istjecanje staničnih proteina i DNK

Spektrofotometrijskim određivanjem apsorbancije dobivena je količina oslobođenih proteina u supernatantu dok je spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije određena količina oslobođene DNK iz stanica domaćina. U svrhu usporedbe rezultata, osim za uzorke ameba i makrofaga inficiranih s *F. novicida* izmjerena je i količina spontano otpuštenih staničnih proteina i DNK kojeg stanice tijekom svog životnog ciklusa ispuste u okoliš.

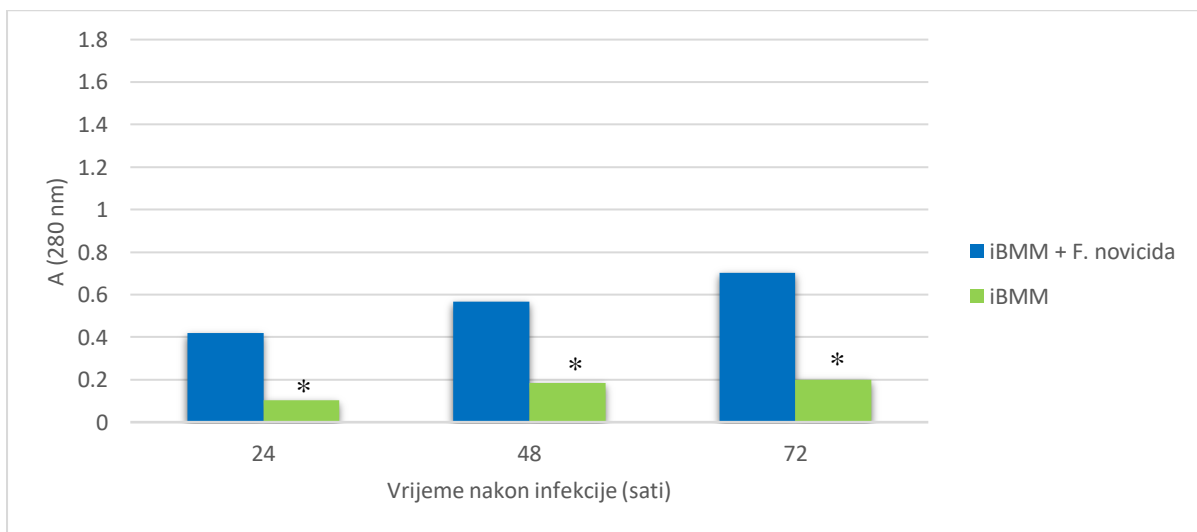
*A. castellanii* spontano tijekom starenja otpušta stanične proteine u medij. Nakon prvih 24 sata zabilježena apsorbancija iznosila je 0,317. Nakon 48 sati povećala se na 0,391 dok je nakon 72 sata zabilježena apsorbancija iznosila 0,427 (Slika 4.). U prisutnosti *F. novicida*, apsorbancija nakon 24 sata od inokulacije je iznosila 0,924, odnosno 1,256 nakon 48 sati. Nakon 72 sata izmjerena apsorbancija bila je najviša i iznosila je 1,573 (Slika 4).



**Slika 4. Istjecanje staničnih proteina iz *A. castellanii* prije i nakon infekcije s *F. novicida*.** Uzorci supernatanta su prikupljeni tijekom tri dana, a apsorbancija je očitana pri 280 nm. \*Rezultati prikazuju statistički značajnu razliku između inficiranih i neinficiranih stanica ameba koja je određena t-testom. Razina od  $p < 0,05$  smatrana je statistički značajnom.

Iz dobivenih rezultata uočeno je da se količina staničnih proteina u okolnom mediju znatno povećala u prisustvu *F. novicida*. Tijekom 72 sata mjerena apsorbancija staničnih proteina koji spontano istječu iz stanica *A. castellanii* bilježi minimalni porast. S porastom broja unutarstaničnih bakterija tijekom 72 sata znatno raste i količina ispuštenih staničnih proteina u medij. Zabilježena je statistički značajna razlika između otpuštenih staničnih proteina u supernatant inficiranih stanica nakon 24 ( $p=0,0001$ ), 48 ( $p=0,0001$ ) i 72 sata ( $p=0,0001$ ) u odnosu na izmjerenu količinu u supernatantu neinficiranih ameba.

Iz imortaliziranih mišjih makrofaga, također tijekom vremena spontano istječe određena količina staničnih proteina. Nakon prvih 24 sata apsorbancija je iznosila 0,102, odnosno 0,184 nakon 48 i 0,201 nakon 72 sata (Slika 5.). Nakon inokulacije *F. novicida* zabilježen je porast staničnih proteina u mediju. Naime, nakon 24 sata od infekcije apsorbancija je iznosila 0,418. Nakon 48 sati od infekcije vrijednost je porasla na 0,567, dok je 72 sata nakon infekcije zabilježena apsorbancija iznosila 0,702 (Slika 5.).

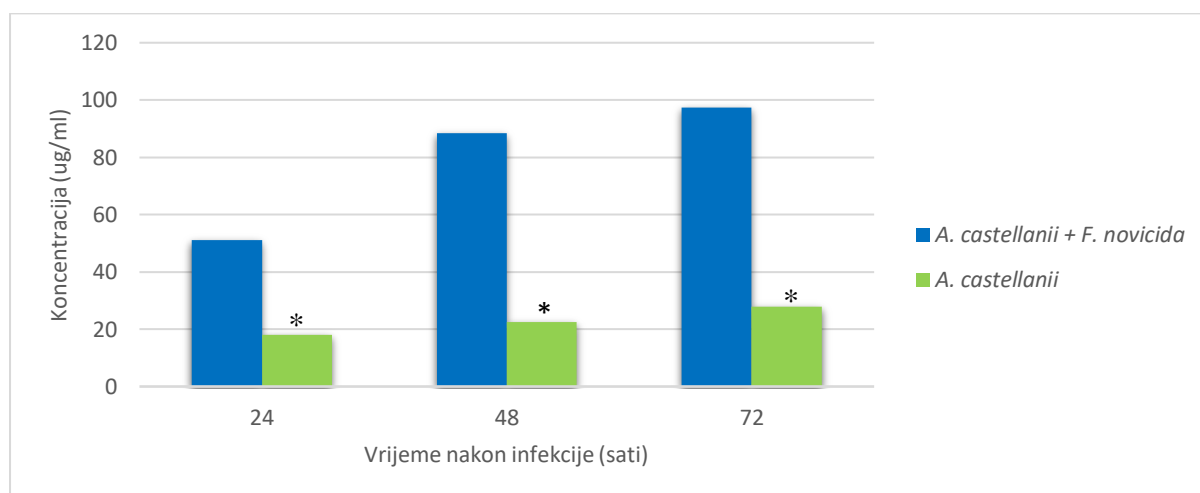


**Slika 5. Istjecanje staničnih proteina iz imortaliziranih mišjih makrofaga prije i nakon infekcije s *F. novicida*.** Uzorci supernatanta su prikupljeni tijekom tri dana, a apsorbancija je očitana pri 280 nm. \*Rezultati prikazuju statistički značajnu razliku između inficiranih i neinficiranih stanica makrofaga koja je određena t-testom. Razina od  $p < 0,05$  smatrana je statistički značajnom.

Rezultati pokazuju da u prisutnosti *F. novicida* u okolni medij istječe znatno više staničnih proteina nego što ih se spontano otpusti tijekom životnog ciklusa makrofaga unutar 72 sata. Rezultati su statistički značajno veći nakon inficiranja tijekom 24 ( $p=0,0002$ ), 48 ( $p=0,0001$ ) i 72 sata ( $p=0,0001$ ) u odnosu na slučaj prije inficiranja stanica.

Evidentno je iz rezultata da iz stanica *A. castellanii* istječe znatno više staničnih proteina u okolni medij, otprilike dva puta više nego što istekne iz stanica makrofaga nakon 24, 48 i 72 sata od infekcije s *F. novicida*.

Spoznajom da tijekom vremena *A. castellanii* spontano u medij ispušta i staničnu DNK, rezultati pokazuju da nakon 24 sata u medij ispusti 18 µg/ml stanične DNK. U sljedećih 24 sata taj je broj porastao na 22,4 µg/ml, a najviša je koncentracija od 27,8 µg/ml zabilježena nakon 72 sata (Slika 6.). U drugom slučaju nakon 24 sata od infekcije u mediju je zabilježena koncentracija DNK od 51 µg/ml. Nakon 48 sati koncentracija je porasla na 88,5 µg/ml, a 72 sata od infekcije koncentracija je bila najviša i iznosila je 97,4 µg/ml (Slika 6.).

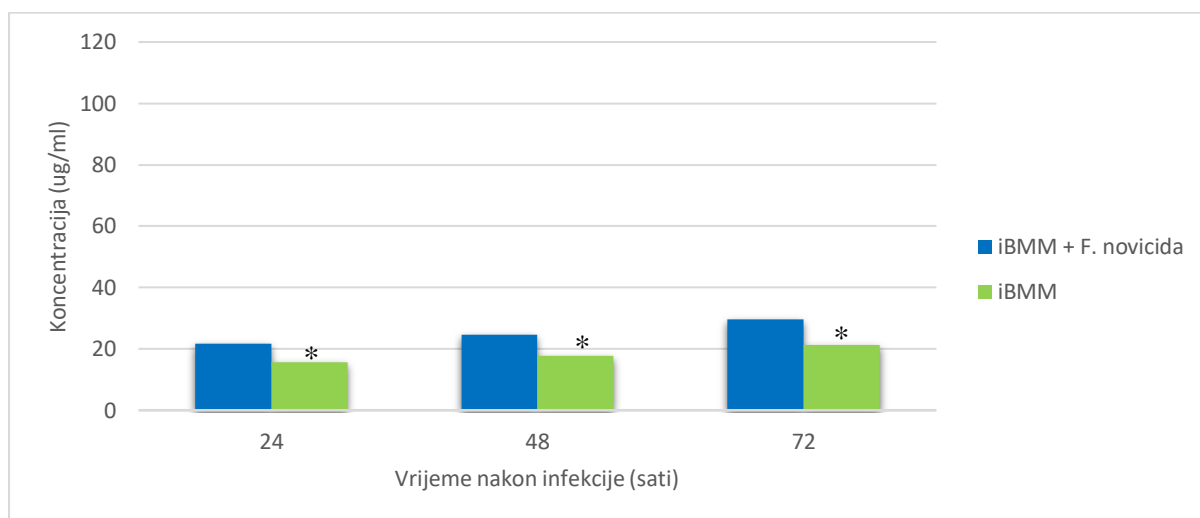


**Slika 6. Istjecanje stanične DNK iz *Acanthamoeba castellanii* prije i nakon infekcije s *F. novicida*.** Količina stanične DNK izmjerena je iz supernatata koji su prikupljeni tijekom tri dana. \*Rezultati prikazuju statistički značajnu razliku između inficiranih i neinficiranih stanica ameba koja je određena t-testom. Razina od  $p < 0,05$  smatrana je statistički značajnom.

Ovi rezultati pokazuju da se u prisutnosti *F. novicida* koncentracija stanične DNK koja istječe u okolni medij znatno povećava u odnosu na koncentraciju koju ameba spontano ispušta. Zabilježena je statistička značajnost nakon 24 ( $p=0,0005$ ), 48 ( $p=0,0001$ ) i 72 sata ( $p=0,0001$ ). U konačnici, može se vidjeti da s vremenom u oba slučaja koncentracija ispuštene stanične DNK raste, samo što je u prisutnosti *F. novicida* koncentracija 3 do 4 puta veća od spontano otpuštene nakon istog vremenskog odmaka.

Rezultati za spontano istjecanje stanične DNK iz makrofaga pokazuju da je nakon 24 sata u medij otpušteno 15,7 µg/ml. Nakon 48 sati koncentracija je iznosila 17,8 µg/ml, dok je nakon 72 sata porasla na 21,3 µg/ml (Slika 7.). U prisutstvu *F. novicida*, nakon 24 sata

koncentracija stanične DNK u mediju iznosi 21,6 µg/ml. Nakon 48 sati od inficiranja vrijednost je porasla na 24,7 µg/ml odnosno na 29,6 µg/ml nakon 72 sata (Slika 7.).



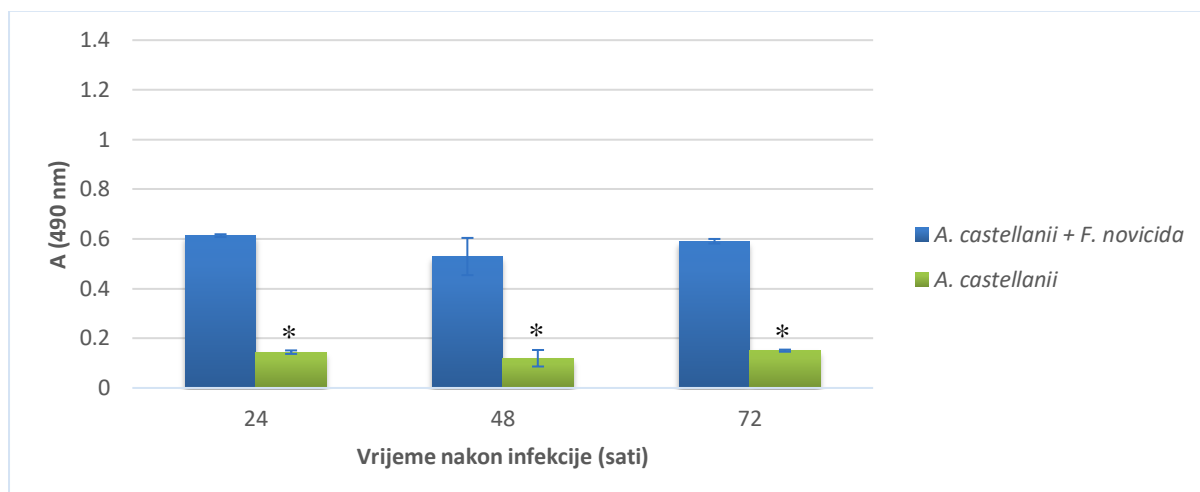
**Slika 7. Istjecanje stanične DNK iz imortaliziranih mišjih makrofaga prije i nakon infekcije s *F. novicida*.** Količina stanične DNK izmjerena je iz supernatanta koji su prikupljeni tijekom tri dana. \*Rezultati prikazuju statistički značajnu razliku između inficiranih i neinficiranih stanica makrofaga koja je određena t-testom. Razina od  $p < 0,05$  smatrana je statistički značajnom.

Iz rezultata za istjecanje stanične DNK iz imortaliziranih mišjih makrofaga vidljivo je da je koncentracija DNK koja istječe u okolni medij konstantno u porastu te da više istječe stanične DNK u prisustvu *F. novicida* unutar imortaliziranih mišjih makrofaga. Zabilježena je statistički značajna razlika nakon 24 ( $p=0,0059$ ), 48 ( $p=0,0058$ ) i 72 sata (0,0017).

Evidentno je iz rezultata da nakon infekcije s *F. novicida* znatno veća količina stanične DNK istječe iz stanica *A. castellanii* u odnosu na onu iz makrofaga. Nakon 24 sata otprilike 2,5 puta više stanične DNK istekne iz *A. castellanii*, dok je nakon 48 i 72 sata količina otprilike 3 do 3,5 puta veća u okolnom mediju ameba, negoli u okolnom mediju makrofaga.

### 4.3. Oslobodena stanična laktat dehidrogenaza

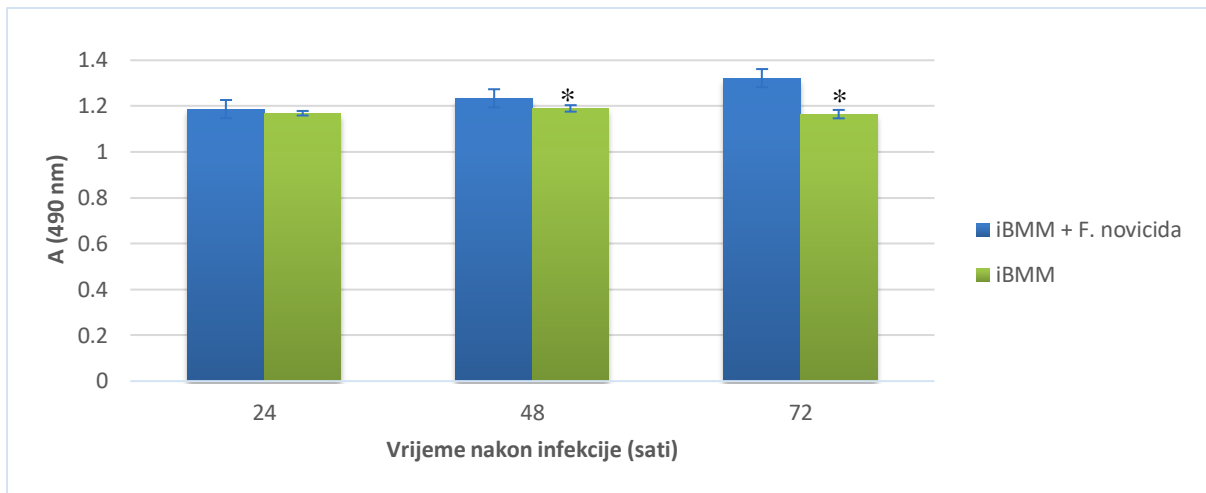
*A. castellanii* spontano otpušta u okolni medij enzim laktat dehidrogenazu, a vrijednost izmjerene apsorbancije nakon prvih 24 sata iznosila je 0,144. Nakon 48 sati vrijednost je porasla na 0,1195, a najviša apsorbancija zabilježena je nakon 72 sata i iznosila je 0,15 (Slika 8.). U prisustvu *F. novicida* zabilježena apsorbancija nakon 24 sata iznosila je 0,613. Nakon 48 sati vrijednost se smanjila na 0,529, a 72 sata nakon inficiranja porasla je na 0,5905 (Slika 8.).



**Slika 8. LDH iz *A. castellanii* prije i nakon infekcije s *F. novicida*.** Uzorci supernatanta su sakupljeni svakodnevno tijekom tri dana i u međuvremenu čuvani na 4 °C u hladnjaku. Apsorbancija je izmjerena pri 492 nm. Za izradu grafikona upotrijebljena je srednja vrijednost rezultata te je izračunata standardna devijacija. \*Rezultati prikazuju statistički značajnu razliku u količini otpuštenog LDH između inficiranih i neinficiranih stanica ameba koja je određena t-testom. Razina od  $p < 0,05$  smatrana je statistički značajnom.

Iz rezultata se može uočiti da količina otpuštenog LDH u okolnom mediju prije inficiranja stanica *A. castellanii* praktički stagnira, odnosno bilježi lagani pad nakon 48 sati u odnosu na prva 24 sata, a zatim bilježi blagi porast nakon 72 sata. Vidljivo je (Slika 8.) da je znatno više LDH otpušteno u supernatant u prisutnosti *F. novicida* i zabilježena je statistički značajna razlika nakon 24 ( $p=0,0001$ ), 48 ( $p=0,0001$ ) i 72 sata ( $p=0,0001$ ). Nakon infekcije postoji varijacija u rezultatima s obzirom da je vrijednost apsorbancije najviša nakon 24 sata, a zatim nakon 72 te najniža nakon 48 sati. U konačnici može se zaključiti da porastom broja bakterija unutar stanice raste i količina otpuštenog LDH.

Nakon 24 sata apsorbancija u slučaju spontanog istjecanja LDH kod makrofaga je iznosila 1,169, odnosno 1,19 nakon 48 sati. Nakon 72 sata zabilježena apsorbancija iznosila je 1,165 (Slika 9.). Nakon 24 sata od infekcije imortaliziranih mišjih makrofaga s *F. novicida* apsorbancija je iznosila 1,187. Nakon 48 sati vrijednost se povećala na 1,234, a nakon 72 sata zabilježena je najviša apsorbancija koja je iznosila 1,322 (Slika 9.).



**Slika 9. LDH iz imortaliziranih mišjih makrofaga prije i nakon infekcije s *F. novicida*.** Uzorci supernatanta su sakupljeni tijekom tri dana i u međuvremenu čuvani na 4 °C u hladnjaku. Apsorbancija je izmjerena pri 492 nm. Za izradu grafikona upotrijebljena je srednja vrijednost rezultata te je izračunata standardna devijacija. \*Rezultati prikazuju statistički značajnu razliku u količini otpuštenog LDH između inficiranih i neinficiranih stanica makrofaga koja je određena t-testom. Razina od  $p < 0,05$  smatrana je statistički značajnom.

Prateći vrijednosti apsorbancije u slučaju količine LDH prije i nakon inficiranja makrofaga dobiveni su rezultati koji pokazuju da se tijekom vremena količina LDH u okolnom mediju povećava u slučaju nakon infekcije imortaliziranih mišjih makrofaga s *F. novicida* dok se u slučaju spontanog otpuštanja LDH nakon 72 sata bilježi blagi pad vrijednosti apsorbancije u odnosu na vrijednosti zabilježene nakon 24 i 48 sati. Statistički značajna razlika između količine LDH spontano otpuštenog i LDH koji istječe pod utjecajem unutarstaničnog mikroorganizma u ovom slučaju je zabilježena nakon 48 ( $p=0,0129$ ) i 72 sata ( $p=0,0003$ ) dok nakon 24 sata od infekcije rezultati nisu statistički značajno različiti ( $p=0,0794$ ).

Iz rezultata se može vidjeti da otprilike dva puta veća količina enzima LDH istječe pri oštećenju stanica makrofaga, u odnosu na zabilježenu količinu iz stanica *A. castellanii* nakon 24, 48 i 72 sata od infekcije s *F. novicida*.



## 5. RASPRAVA

*Francisella novicida* je korištena u ovom zvršnom radu kao pogodan bakterijski model za provođenje istraživanja prvenstveno zbog svoje avirulentnosti za ljude, a zatim zbog visoke podudarnosti DNK sekvence s virulentnom, a i dalje nedovoljno istraženom vrstom *F. tularensis* subsp. *tularensis* koja kao potencijalno biološko oružje stvara veliku prijetnju u današnjem svijetu.

*F. novicida* posjeduje lakoću ulaska u razne stanične domaćine, uključujući hepatocite, plućne i epitelne stanice. Prvenstveno se to odnosi na makrofage u kojima na prethodno opisan način preživljava, a zatim i amebe koje predstavljaju okolišni rezervoar i opisuju se kao „Trojanski konj“ u njezinom širenju kao i u širenju ostalih patogenih unutarstaničnih bakterija poput *Legionella pneumophila* i *Mycobacterium tuberculosis* (82). Iako je niz istraživanja na temu unutarstaničnog preživljavanja provedeno na LVS soju bakterije *F. tularensis* unutar slobodno živućih ameba i makrofaga glodavaca, tek neko starije istraživanje je koristilo upravo *F. novicida*.

Jedno od takvih istraživanja provedeno je 1991. godine u Kanadi na glodavcima uključujući miševe, štakore i zamorce. Rezultati tog istraživanja za kinetiku rasta sukladni su ovdje dobivenim za prva 24 sata kada se bilježi eksponencijalni rast unutarstaničnih bakterija dok u nastavku njihovih ispitivanja broj *F. novicida* konstantno raste tijekom 48 sati, a zatim stagnira što se razlikuje od rezultata ovog završnog rada. Na temelju njihovih daljnjih opažanja zaključeno je da *F. novicida* preživljava unutar makrofaga miševa i zamoraca dok unutar makrofaga štakora zbog mogućeg nedostatka receptora na njihovoj površini ne uspijeva održati unutarstanični rast (65).

Općenito, *F. novicida* je izolirana pretežito iz uzoraka stajaće slane i bočate vode koje su ujedno i stanište mnogobrojnih protozoa s naglaskom na amebe. Istraživanje slobodno živućih ameba kao potencijalnog rezervoara roda *Francisella* široko se provodi na vrstama LVS soja. Takvo je istraživanje objavljeno 2002. godine u Švedskoj, a ispitano je preživljavanje LVS soja unutar trofozoita i cisti *A. castellanii*. Podaci dobiveni tim istraživanjem u skladu su s ovdje prikazanim rezultatima za *F. novicidu*. Protekom vremena, bilježi se porast unutarstaničnih mikroorganizama te je uočen citopatski utjecaj na stanicu domaćina. Međutim, iako su u istraživanju izneseni preliminarni dokazi za preživljavanje *F. tularensis* u amebnim cistama,

autori zaključuju da potencijal za opstanak u različitim vrstama nepovoljnih uvjeta unutar cista još uvijek treba sustavno ispitati (77).

Ispitivanje citopatskog učinka na stanice domaćina uključuje mjerenja količine otpuštenog enzima laktat dehidrogenaze koji služi kao potencijalni pokazatelj smrti stanica. Istraživanje provedeno 2001. godine u Švedskoj pokazalo je da LVS soj *F. tularensis* ne uzrokuje endogenu LDH aktivnost ako se aerobno uzgaja. Nakon tretmana citokalasinom D, citopatski učinak nakon 24 sata koji nastaje kao posljedica infekcije stanične linije mišjih makrofaga J774 s *F. tularensis*, znatno je umanjen, što je praćeno oslobađanjem LDH. Takvi rezultati sukladni su s ovdje prikazanim s obzirom da se povećanjem količine laktat dehidrogenaze u supernatantu istovremeno i smanjuje broj *F. novicida* unutar makrofaga (64).

Također, istraživanja unutarstaničnog rasta uveliko se provode s vrstama roda *Legionella*. Najčešće proučavana vrsta i uzročnik legionarske bolesti, odnosno teških pneumonija je *Legionella pneumophila*. Proučavanje u svrhu molekularne osnove interakcija domaćin-parazit pokazalo je da ova vrsta uspješno održava svoj rast unutar slobodno živućih ameba. Rezultati ispitivanja kinetike rasta *L. pneumophila* unutar *A. castellanii* pokazuju da se tijekom 72 sata od infekcije stanica bilježi eksponencijalni porast broja unutarstaničnih bakterija. Nadalje, rezultati pokazuju da tijekom unutarstaničnog razmnožavanja *L. pneumophila* oštećuje stanice ameba i dovodi do lize (83,84). Takvi rezultati sukladni su rezultatima ovog završnog rada te se može primjetiti sličnost u načinu kojim *Francisella* subsp. i *Legionella* subsp. preživljavaju u okolišu, poglavito unutar vodenih ekosustava.

Ovaj završni rad ima za cilj prikazati razliku u porastu broja *F. novicida* unutar dva različita tipa stanica te na koju staničnu kulturu mikroorganizam ima veći citopatski učinak.

Rezultati pokazuju da broj *F. novicida* unutar *A. castellanii* konstantno raste dok bakterija u potpunosti ne uništi stanicu što je i očekivano na temelju dosadašnjih istraživanja koja pokazuju da se *Francisella* pojačano replicira u medijima predodređenim za rast ameba. U slučaju preživljavanja unutar makrofaga bakterijski porast se bilježi tijekom prva 24 sata, a kasnije znatno opada broj unutarstaničnih *F. novicida*. Vjerojatno je, da prestanak proliferacije bakterija nastaje razaranjem povoljnog okruženja unutar makrofaga.

Tijekom porasta broja *F. novicida* unutar *A. castellanii* raste i količina otpuštenih staničnih proteina i DNK. S obzirom na spontano otpuštene, uočava se značajna statistička razlika u prisutnosti patogena nakon svakog vremenskog odmaka. Smanjivanjem broja unutarstaničnih *F. novicida* unutar makrofaga nakon 48 i 72 sata, količina ispuštenih staničnih proteina, DNK i LDH konstantno raste. Statistički značajno veća razlika u rezultatima sugerira da dolazi do izrazitog citopatskog učinka. Nadalje, rezultati pokazuju da puno veća količina staničnih proteina kao i stanične DNK istječe pri lizi *A. castellanii* nego pri lizi makrofaga što sugerira da bakterija ima znatniji citopatski učinak na amebe. S druge strane, količina otpuštenog LDH je veća u slučaju inficiranja makrofaga u odnosu na amebe.

Iako postoje ispitivanja provedena na bakteriji *F. novicida*, ona je i dalje nedovoljno istražena u odnosu na ostale unutarstanične patogene, te je niz pitanja ostalo neodgovoreno. Uvjeti unutarstaničnog preživljavanja, utjecaj gena *Francisella* patogenog otoka na životni ciklus i čimbenici koji uzrokuju upalni odgovor teme su koje tek treba do kraja razjasniti.

## 6. ZAKLJUČAK

Iz rezultata za kinetiku rasta, podataka o staničnim proteinima, DNK i LDH u supernatantu koji su dobiveni tijekom laboratorijskog rada moguće je iznijeti sljedeće zaključke:

- Unutarstanični uvjeti u amebama i makrofagima povoljni su za razmnožavanje *F. novicida*,
- *F. novicida* se bolje i duže razmnožava unutar *A. castellani*, negoli unutar makrofaga
- U prisustvu *F. novicida* količina otpuštenih staničnih proteina, DNK i LDH je statistički značajno veća od spontano otpuštenih prije infekcije za obje stanične kulture
- Veći citopatski učinak i oštećenje se ostvaruju u stanicama *A. castellanii* negoli u stanicama sisavaca.

## 7. LITERATURA

1. Sjostedt, A. Family XVII. Francisellaceae, genus I. Francisella. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2005;pp. 200–210.
2. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. Medical microbiology. Elsevier Health Sciences; 2015.
3. Brevik, Ø., Ottem, K., Kamaishi, T., Watanabe, K. and Nylund, A. Francisella halioticida sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. Journal of Applied Microbiology, 2011.; 111:1044-1056. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05133.x
4. Larson, M. A., Nalbantoglu, U., Sayood, K., Zentz, E. B., Cer, R. Z., Iwen, P. C., ... & Hinrichs, S. H. Reclassification of *Wolbachia persica* as *Francisella persica* comb. nov. and emended description of the family Francisellaceae. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2016; 66(3), 1200-1205.
5. Challacombe, J. F., Petersen, J. M., Hodge, D., Pillai, S., & Kuske, C. R. Whole-genome relationships among Francisella bacteria of diverse origins define new species and provide specific regions for detection. Appl. Environ. Microbiol. 2017; 83(3), e02589-16.
6. Thelaus, J., Lundmark, E., Lindgren, P., Sjödin, A., & Forsman, M. Galleria mellonella reveals niche differences between highly pathogenic and closely related strains of Francisella spp. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2018; 8, 188.
7. McCoy GW. Some features of the squirrel plague problem. Cal. State J. Med. 1911; 9:105–109.
8. Francis, E., Bruce Mayne, & G. C. Lake. Tularemia Francis Public Health Reports 1921; (1896-1970), 1921; 36(30), 1731-1753. doi:10.2307/4576069
9. Sjöstedt, A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. Annals of the New York Academy of Sciences. 2007; 1105(1), 1-29.
10. Eigelsbach, H. T., Braun, W., & Herring, R. D. Studies on the variation of *Bacterium tularense*. Journal of Bacteriology. 1951; 61(5), 557.
11. Champion, M. D., Zeng, Q., Nix, E. B., Nano, F. E., Keim, P., Kodira, C. D., ... & Pearson, M. Comparative genomic characterization of Francisella tularensis strains belonging to low and high virulence subspecies. PLoS pathogens. 2009; 5(5).
12. Anthony, L. D., Burke, R. D., & Nano, F. E. Growth of Francisella spp. in rodent macrophages. Infection and immunity. 1991; 59(9), 3291-3296.
13. Lauriano, C. M., Barker, J. R., Yoon, S. S., Nano, F. E., Arulanandam, B. P., Hassett, D. J., & Klose, K. E. MglA regulates transcription of virulence factors necessary for Francisella tularensis intraamoebae and intramacrophage survival. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004; 101(12), 4246-4249.
14. Masters, B. R. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Eds: John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser. ISBN: 13-978-1-4557-4801-3, Elsevier Saunders, 2015.
15. Olsufjev N.G. Tularemia. WHO Inter-regional Travelling Seminar on Natural Foci of Zoonoses, Moscow., 1974; 28 pp. 1130

16. Kalenić S, Mlinarić-Missoni E. Medicinska bakteriologija i mikologija. 2. izd. Zagreb: Merkur A.B.D., 2005; 02-1310/3-2001.
17. Oyston, P.C., Sjostedt, A., and Titball, R.W. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2: 967–978.
18. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:225–30
19. Eigelsbach, H. T., and V. G. McGann. Gram-negative aerobic cocci, p. 394-399. In N. R. Krieg and J. G. Holtz (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.
20. Jusatz, H. J. The geographical distribution of tularemia throughout the world, 1911-1959, p. 38. In *World-atlas of epidemic diseases*, vol. 3. Falk Verlag, Hamburg, Federal Republic of Germany, 1961.
21. Rohmer L., Brittnacher M., Svensson K., et al. Potential source of *Francisella tularensis* live vaccine strain attenuation determined by genome comparison. *Infection and Immunity.* 2006;74(12):6895–6906. doi: 10.1128/iai.01006-06.
22. Forsman, M., Sandstrom, G., and Jaurin, B. Identification of *Francisella* species and discrimination of type A and type B strains of *F. tularensis* by 16S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56: 949–955
23. Molins CR, Delorey MJ, Yockey BM, Young JW, Belisle JT, Schriefer ME, Petersen JM. Virulence difference between the prototypic Schu S4 strain (A1a) and *Francisella tularensis* A1a, A1b, A2 and type B strains in a murine model of infection. *BMC Infect Dis* 2014; 14:67. doi:10.1186/1471-2334-14-67.
24. Ellis J., Oyston C.F., Green M., Titball R.W., Tularemia, *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 2002; 631–646.
25. Forsman, M., E. W. Henningson, E. Larsson, T. Johansson, and G. Sandstrom. *Francisella tularensis* does not manifest virulence in viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol.* 2000; *Ecol.*31:217-224.
26. Larson Cl, Wicht W, Jellison Wl. A new organism resembling *P. tularensis* isolated from water. *Public Health Rep.* 1955;70(3):253–258.
27. Johansson A, Celli J, Conlan W, Elkins KL, Forsman M, Keim PS, Larsson P, Manoil C, Nano FE, Petersen JM, Sjostedt A. 2010. Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1717–1718; author reply 1718–1720. doi:10.1099/ijs.0.022830-0.
28. Forsman, M., G. Sandstrom, and A. Sjostedt. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994; 44:38-46.
29. Hollis D. G., Weaver R. E., Steigerwalt A. G., Wenger J. D., Moss C. W., Brenner D. J. *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1989; 1601–1608
30. Vildana Semić, Martin Brezovec, Iva Lazarić, Marina Šantić *Ekologija, domaćini i vektori bakterije Francisella tularensis medicina* 2009, Vol. 45, No. 2, p. 154-159

31. Birdsell D, et al. *Francisella tularensis* subsp. *novicida* isolated from a human in Arizona. *BMC Res.* 2009. Notes 2:223
32. Kingry LC, Petersen JM. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:35. Published 2014 Mar 13. doi:10.3389/fcimb.2014.00035
33. Barns S. M., Grow C. C., Okinaka R. T., Keim P., Kuske C. R. Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71, 5494–5500 10.1128/AEM.71.9.5494-5500.
34. <https://www.diseaseinfosearch.org/Tularemia/7264> (pristupljeno: 18.04.2020.)
35. Oyston, Petra CF. "*Francisella tularensis*." *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* 2006; 281-284.
36. Francis E. Microscopic changes of tularemia in the tick *Dermacentor andersoni* and the bedbug *Cimex lectularius*. *Public Health Rep.* 1927; 42, 2763–2772
37. Francis, Edward: Deer-Fly Fever; a Disease of Man of Hitherto Unknown Etiology , *Pub. Health Rep.* 34:2061-2062 ( (Sept. 12) ) 1919.
38. Choi, E. Tularemia and Q fever. *Med Clin North Am*, 2002; 86: 393–416
39. Petersen, J. M., and M. E. Schriefer. Tularemia: emergence/re-emergence. *Vet. Res.* 2005; 36:455-467.
40. Ohara, Y., T. Sato, H. Fujita, T. Ueno, and M. Homma. Clinical manifestations of tularemia in Japan — analysis of 1355 cases observed between 1924 and 1987. *Infection* 1991; 19:14-17
41. Mörner, T. The ecology of tularaemia. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Épizooties*, 1992; 11, 1123-1123.
42. JELLISO N W.L. Tularemia in North America. Univ. of Montana, Missoula, Montana, 1974; 276 pp
43. JELLISO N W.L., OWE N C , BEL L J.F. & KOHL S G.M. Tularemia and animal populations. *Wildl. Dis.*, 1961; 17, 22 pp.
44. Hubalek, Z., W. Sixl, and J. Halouzka. *Francisella tularensis* in *Dermacentor reticulatus* ticks from the Czech Republic and Austria. *Wien. Klin. Wochenschr.* 1998; 110:909-910.
45. Santic M., Al-Khodor S., Abu Kwaik Y. Cell biology and molecular ecology of *Francisella tularensis*. *Cell. Microbiol.* 2010; 12, 129–139
46. Dennis, D.T., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., Bartlett, J.G., Ascher, M.S., Eitzen, E., et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. 2001; *JAMA* 285: 2763–2773
47. Provenza, J. M., S. A. Klotz, and R. L. Penn. Isolation of *Francisella tularensis* from blood. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24:453- 455.
48. Koskela, P. E. N. T. T. I., and A. I. M. O. Salminen. "Humoral immunity against *Francisella tularensis* after natural infection." *Journal of clinical microbiology* 22.6 1985: 973-979.
49. Horwitz, M. A. Intracellular parasitism. *Curr. Opin. Immunol.* 1988; 1:41-46.
50. Buddingh GJ, Womack FC. Observations on the infection of chick embryos with *Bacterium tularense*, *brucella*, and *Pasteurella pestis*. *J Exp Med.* 1941;74(3):213–222

51. Nano FE, Schmerk C. The Francisella pathogenicity island. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1105:122–137.
52. Nano F. E., Zhang N., Cowley S. C., Klose K. E., Cheung K. K. M., Roberts M. J., Ludu J. S., Letendre G. W., Meierovics A. I. other authors A Francisella tularensis pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J Bacteriol* 2004; 186:6430–6436
53. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of Francisella tularensis. Forslund AL, Kuoppa K, Svensson K, Salomonsson E, Johansson A, Byström M, Oyston PC, Michell SL, Titball RW, Noppa L, Frithz-Lindsten E, Forsman M, Forsberg A. *Mol Microbiol.* 2006 Mar; 59(6):1818–30.
54. Fortier, A. H., D. A. Leiby, R. B. Narayanan, E. Asafodjei, R. M. Crawford, C. A. Nancy, and M. S. Meltzer. Growth of Francisella tularensis LVS in macrophages: the acidic intracellular compartment provides essential iron required for growth. *Infect. Immun.* 1995; 63:1478-1483.
55. Pan X, Tamilselvam B, Hansen EJ, Daepler S. Modulation of iron homeostasis in macrophages by bacterial intracellular pathogens. *BMC Microbiol.* 2010;10:64.
56. Steiner, Don J., Yoichi Furuya, and Dennis W. Metzger. "Host–pathogen interactions and immune evasion strategies in Francisella tularensis pathogenicity." *Infection and drug resistance* 7, 2014; 239.
57. Lindgren H, Shen H, Zingmark C, Golovliov I, Conlan W, Sjöstedt A. Resistance of Francisella tularensis strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. *Infect Immun.* 2007;75(3):1303–1309.
58. Malik M., Bakshi C. S., McCabe K., Catlett S. V., Shah A., Singh R., Jackson P. L., Gaggar A., Metzger D. W. other authors Matrix metalloproteinase 9 activity enhances host susceptibility to pulmonary infection with type A and B strains of Francisella tularensis. *J Immunol* 2007; 178:1013–1020
59. Thomas R. M., Titball R. W., Oyston P. C. F., Griffin K., Waters E., Hitchen P. G., Michell S. L., Grice I. D., Wilson J. C., Prior J. L. The immunologically distinct O antigens from Francisella tularensis subspecies tularensis and Francisella novicida are both virulence determinants and protective antigens. *Infect Immun* 2007; 75:371–378
60. Cowley, S. C., S. V. Myltseva, and F. E. Nano. Phase variation in Francisella tularensis affecting intracellular growth, lipopolysaccharide antigenicity and nitric oxide production. *Mol. Microbiol.* 1996; 20:867-874.
61. Thakran, S., Li, H., Lavine, C. L., Miller, M. A., Bina, J. E., Bina, X. R. & Re, F. Identification of Francisella tularensis lipoproteins that stimulate the Toll-like receptor (TLR) 2/TLR1 heterodimer. *J Biol Chem* 2007; 283, 3751–3760.
62. Schoenborn JR, Wilson CB "Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses". *Adv. Immunol.* 2007; 96: 41–101. PMID 17981204
63. Smojver-Ježek, Silvana. Morfometrija i statička DNA citometrija makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku bolesnika sa sarkoidozom [Morphometry and statical DNA cytometry of macrophages in bronchoalveolar lavage fluid in patients with sarcoidosis]. *Diss. Sveučilište u Zagrebu*, 2009.



64. Lai, X. H., I. Golovliov, and A. Sjöstedt. *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infect. Immun.* 2001; 69:4691-4694
65. Anthony, L.S.D., Burke, R.D., and Nano, F.E. Growth of *Francisella* spp. in rodent macrophages. *Infect Immun* 1991; 59: 3291–3296.
66. Francis, E. Microscopic changes of tularemia in the tick *Dermacentor andersoni* and the bedbug *Cimex lectularius*. *Public Health Rep.* 1927; 42:2763-2772.
67. Clemens, D. L., B. Lee, and M. A. Horwitz. Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect. Immun.* 2004; 72:3204-3217
68. Santic M, Molmeret M, Klose KE, Jones S, Kwaik YA. The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IglC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell Microbiol.* 2005;7(7):969–979.
69. Lofgren, S., A. Tarnvik, G. D. Bloom, and W. Sjöberg. Phagocytosis and killing of *Francisella tularensis* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 1983; 39:715-720.
70. Fortier, A., D. Leiby, R. Narayanan, E. Asafoadjel, R. Crawford, C. Nacy, and M. Meltzer. Growth of *Francisella tularensis* LVS in macrophages: the acidic intracellular compartment provides essential iron required for growth. *Infect. Immun.* 1995; 63:1478-1483.
71. Golovliov, I., V. Baranov, Z. Krocova, H. Kovarova, and A. Sjöstedt. An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *F. tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect. Immun.* 2003; 71:5940-5950
72. Forestal CA, et al. *Francisella tularensis* has a significant extracellular phase in infected mice. *J. Infect. Dis.* 2007; 196:134–137
73. Molmeret, Maëlle, et al. "Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens." *Appl. Environ. Microbiol.* 71.1, 2005; 20-28.
74. Free-living amoebae in the water resources of Iran: a systematic review. Saburi E, Rajaii T, Behdari A, Kohansal MH, Vazini H *J Parasit Dis.* 2017 Dec; 41(4):919-928.
75. Checroun, C., T. D. Wehrly, E. R. Fischer, S. F. Hayes, and J. Celli. Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103:14578-14583.
76. Ožanić M, Marečić V, Gobin I, Šantić M. Intracellular life of *Francisella* and *Legionella* within amoebae cells. *Medicina Fluminensis* [Internet]. 2016 [pristupljeno 30.04.2020.];52(1):49-54.
77. Survival and Growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. Hadi Abd, Thorsten Johansson, Igor Golovliov, Gunnar Sandström, Mats Forsman *Applied and Environmental Microbiology* Jan 2003, 69 (1) 600-606; DOI: 10.1128/AEM.69.1.600-606.2003
78. Brezovec M, Iljazović A, Zaharija Z, Ožanić M, Šantić M. iglD ima važnu ulogu u unutarstaničnom razmnožavanju *F. tularensis* u *A. castellanii*. *Medicina Fluminensis* [Internet]. 2010 [pristupljeno 01.05.2020.];46(1):65-68.
79. <https://www.cdc.gov/training/quicklearns/biosafety/> (pristupljeno: 6.5.2020.)

80. Baltaza, W., Padzik, M., Szaflik, J. P., Dybicz, M., Hendiger, E., & Chomicz, L. Amoebicidal or amoebostatic influence of disinfectants used in health facilities and laboratories on corneal strains of *Acanthamoeba*. *Annals of parasitology*, 2017; 63(3), 167-172.
81. <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/cytotox-96-non-radioactive-cytotoxicity-assay-protocol/> (Pristupljeno: 29.02.2020.)
82. Siddiqui, R., & Khan, N. A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & vectors*, 2012; 5(1), 6.
83. Moffat, Jennifer F.; Tompkins, L. S. A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infection and immunity*, 1992, 60.1: 296-301.
84. Holden, Edsel P., et al. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba castellanii* Neff. *Infection and immunity*, 1984, 45.1: 18-24.

## **8. KRATKI ŽIVOTOPIS PRISTUPNIKA**

### **OSOBNNE INFORMACIJE:**

**IME I PREZIME:** Iva Tić

**DATUM ROĐENJA:** 10.7.1998.

**ADRESA STANOVANJA:** Ružice Mihić 13, 51000 Rijeka (Hrvatska)

**KONTAKT:** +385 91/464 63 23

**MAIL:** iva.tic1@gmail.com

### **OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE:**

**2005.-2013.:** Osnovna škola „Fran Franković“, Rijeka (Hrvatska)

**2013.-2017.:** Prirodoslovna i grafička škola Rijeka, (smjer: Prirodoslovna gimnazija)

**2017.-2020.:** Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva  
Medicinski fakultet Rijeka (Hrvatska)