

Uloga igli mutante *Francisella tularensis* soj LVS u eksperimentalnoj tularemiji

Nefat, Vedrana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:184:338673>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Vedrana Nefat

ULOGA *igli* MUTANTE *FRANCISELLA TULARENSIS*
SOJ LVS U EKSPERIMENTALNOJ TULAREMIJI

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Vedrana Nefat

ULOGA *iglI* MUTANTE *FRANCISELLA TULARENSIS*
SOJ LVS U EKSPERIMENTALNOJ TULAREMIJI

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marina Šantić

Diplomski rad obranjen je dana 04.07.2022., na Sveučilištu u Rijeci, Medicinski fakultet, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Mateja Ožanić
2. doc. dr. sc. Mirna Mihelčić
3. prof. dr. sc. Marina Šantić

Rad sadrži 41 stranicu, 10 slika, 60 literaturnih navoda.

ZAHVALA

U prvom redu zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Marini Šantić dipl. sanit. ing. na iskazanom povjerenju, temi, savjetima i ljubaznošću tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Također, hvala Ini Viduki mag. sanit. ing. na nesebičnoj pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Najveće Hvala upućujem svojim roditeljima i sestri koji su najzaslužniji za moja postignuća, gurajući me uvijek naprijed i pružajući mi najveću potporu i podršku tijekom cijelog obrazovanja.

Za kraj, hvala i svim mojim prijateljima koji su mi pružali potporu i uljepšali moje studentsko razdoblje.

Hvala Vam!

SAŽETAK

Francisella tularensis je gram-negativna unutarstanična bakterija. Pripada porodici *Francisellaceae* i uključuje 3 podvrste: *tularensis*, *holarctica* i *mediasiatica* koje se međusobno razlikuju u virulenciji, geografskoj rasprostranjenosti i ekologiji. *Francisella* je uzročnik tularemije, re-emergentne bolesti ljudi, domaćih i divljih životinja. *Francisella* ima sposobnost inficirati makrofage, nakon čega različitim mehanizmima koji trenutno nisu u potpunosti definirani, bježi iz fagosoma te se opsežno replicira u citosolu. Živi atenuirani soj LVS (engl. *Live Vaccine Strain*), koji je dobiven iz podvrste *holarctica*, nije virulentan za ljude no vrlo je virulentan za miševe stoga je idealan za proučavanje mehanizma virulencije roda *Francisella*. U stanicama sisavaca veliku ulogu za preživljavanje i replikaciju te posljedično virulenciju *Francisella* imaju geni koji se nalaze unutar *Francisella* patogenog otoka (engl. *Francisella pathogenicity island*, FPI). Gen *iglI* neophodan je za virulenciju, citotoksičnost i bijeg iz fagosoma. Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi ulogu *iglI* gena *in vivo* praćenjem preživljavanja i određivanjem broja bakterija u organima intradermalno inficiranih miševa. Također, ispitivao se i imunološki odgovor domaćina sintezom interferon gamma (IFN- γ) i interleukin 10 (IL-10) citokina, *in vivo* na C57BL/6 miševima nakon intradermalne infekcije s *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, mutantom *iglI* i njenom komplementantom *iglI/iglI*. Kod testa preživljavanja miševa, tijekom 15 dana praćeno je 10 miševa po skupini koji su intradermalno inficirani. Za određivanje broja bakterija u tkivu jetre, slezene i pluća, 3 miša po skupini inficirani su s LD₅₀ (5 x 10⁴ bakterija/mišu), te su 6, 24, 48, 72 sata nakon infekcije organi odstranjeni i dalje analizirani. qRT-PCR-om određena je razina IFN- γ i IL-10 citokina u tkivu jetre, slezene i pluća 72 sata nakon intradermalne infekcije miševa kako bi se ispitalo odnos između mutante *iglI*, divljeg soja LVS te komplementante *iglI/iglI*. Miševi inficirani *iglI* mutantom imali su 100% preživljavanje kod svih ispitivanih doza što se ne može reći za miševe inficirane s *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Također, broj bakterija mutante *iglI* u svim ispitivanim organima bio je statistički značajno smanjen u odnosu na soj LVS. Zaključno možemo reći kako je *iglI* gen važan za unutarstaničnu replikaciju *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS i da ima utjecaj na sintezu IFN- γ i IL-10 citokina u tkivu jetre, slezene i pluća.

Ključne riječi: *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS, *iglI*, IFN- γ , IL-10, miševi, patogeneza

SUMMARY

Francisella tularensis is a gram-negative intracellular bacteria. It belongs to the family *Francisellaceae* and includes three subspecies: *tularensis*, *holarctica* and *mediasiatica* which differ in virulence, geographical distribution and ecology. *Francisella* is the causative agent of tularemia, a re-emerging disease of humans, domestic, and wild animals. *Francisella* has the ability to infect macrophages, whereupon escapes from phagosomes by various mechanisms that are not currently fully defined, and replicates extensively in the cytosol. The live attenuated strain LVS (Live Vaccine Strain), produced from the subspecies *holarctica*, is not virulent to humans but is very virulent to mice and is therefore ideal for studying the virulence mechanism of the genus *Francisella*. In mammalian cells, *Francisella* pathogenicity island (FPI) genes play a major role in the survival, replication, and consequent virulence of *Francisella*. The *iglI* gene is essential for virulence, cytotoxicity, and phagosome escape. The aim of this thesis was to determine the role of *iglI* gene *in vivo* by monitoring survival and determining the number of bacteria in organs of intradermally infected mice. The immune response of the host was also examined by synthesis of interferon gamma (IFN- γ) and interleukin 10 (IL-10) cytokines, *in vivo* in C57BL/6 mice after intradermal infection with *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, *iglI* mutant and its complement *iglI/iglI*. In the mice survival test, 10 mice per group of intradermally infected were followed for 15 days. To determine the number of bacteria in the liver, spleen and lungs tissue, 3 mice per group were infected with LD₅₀ (5×10^4 bacteria/mouse), and the organs were removed 6, 24, 48, 72 hours after infection and further analyzed. The levels of IFN- γ and IL-10 cytokines in liver, spleen and lungs tissue were determined by qRT-PCR, 72 hours after intradermal infection of mice to examine the relationship between *iglI* mutant, wild-type LVS and complement *iglI/iglI*. Mice infected with the *iglI* mutant had 100% survival at all tested doses, which cannot be said for mice infected with *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Also, the number of *iglI* mutant bacteria in all examined organs was statistically significantly reduced compared to the LVS strain. In conclusion, the *iglI* gene is important for intracellular replication of *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS and that it affects the synthesis of IFN- γ and IL-10 cytokines in liver, spleen and lungs tissues.

Keywords: *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS, *iglI*, IFN- γ , IL-10, mice, pathogenesis

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Rod <i>Francisella</i>	1
1.2. Epidemiologija tularemije	2
1.2.1. Izvor zaraze	2
1.2.2. Vektori i drugi načini prijenosa <i>F. tularensis</i>	3
1.2.3. Ulazna vrata infekcije	4
1.2.4. Virulencija i infektivna doza	4
1.2.5. Osjetljivost domaćina	6
1.3. Mehanizam patogeneze <i>F. tularensis</i>	7
1.4. Imunitet i odgovor domaćina na infekciju	9
1.4.1. Interferon gamma (IFN- γ)	9
1.4.2. Interleukin 10 (IL-10)	10
1.5. Tularemija	11
1.5.1. Klinička slika tularemije u ljudi	11
1.5.2. Tularemija u životinja	12
1.6. Dijagnostika tularemije	12
1.7. Liječenje i prevencija	13
1.8. Razvoj cjepiva	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Bakterijski soj	17
3.2. Miševi	17
3.3. Priprema bakterijske suspenzije za infekciju miševa	17
3.4. Postupak infekcije miševa	17
3.5. Postupak određivanja broja bakterija u organima miševa	18
3.6. Izolacija ribonukleinske kiseline (RNA) iz tkiva jetre, slezene i pluća	18
3.7. Mjerenje koncentracije RNA i transkripcija RNA u cDNA	19
3.8. Kvantitativna reverzna transkripcija u stvarnom vremenu s lančanom reakcijom polimeraze (engl. Real – Time Quantitative Reverse Transcription -Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)	19
3.9. Statistička obrada podataka	20
4. REZULTATI	21
4.1. Rezultati preživljavanja C57BL/6 miševa nakon intradermalne infekcije	21

4.1.1. Praćenje preživljavanja C57BL/6 miševa nakon intradermalne infekcije dozom 5×10^4 bakterija/mišu.....	21
4.1.2. Praćenje preživljavanja C57BL/6 miševa nakon intradermalne infekcije dozom 5×10^5 bakterija/mišu.....	22
4.1.3. Praćenje preživljavanja C57BL/6 miševa nakon intradermalne infekcije dozom 5×10^6 bakterija/mišu.....	23
4.2. Rezultati razmnožavanja bakterija u tkivu jetre, slezene i pluća	24
4.2.1. Razmnožavanje bakterija u tkivu jetre	24
4.2.2. Razmnožavanje bakterija u tkivu slezene	25
4.2.3. Razmnožavanje bakterija u tkivu pluća	26
4.3. Razina mRNA citokina IFN- γ i IL-10 u tkivu jetre, slezene i pluća	27
5. RASPRAVA	30
6. ZAKLJUČAK	34
7. LITERATURA	35
8. KRATKI ŽIVOTOPIS PRISTUPNIKA	41

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Rod *Francisella*

Francisella tularensis pripada u red *Thiotrichales*, porodicu *Francisellaceae* i rod *Francisella* (1). Bakterija je gram-negativna, ne sporogena, aerobna/ mikroaerofilna, nepokretna, ima tanku kapsulu i ne sadrži pile (2). Francizele su unutarstanični patogeni, koji se mogu pronaći kod mnogih životinjskih vrsta i ljudi. Unutar roda *Francisella* nalaze se četiri glavne vrste; *F. tularensis*, *F. philomiragia*, *F. novicida*, *F. noatunensis*. Postoje tri podvrste *F. tularensis*: *tularensis* (tip A), *holarctica* (tip B) i *mediasiatica* (3).

F. tularensis je vrlo virulentan patogen koji može uzrokovati ozbiljnu i potencijalno smrtonosnu bolest putem inhalacije stoga se klasificira kao patogen rizika 3 odnosno istraživanja se moraju provoditi u laboratorijima označenima kao razina biološke sigurnosti 3 (engl. *biosafety level 3*, BSL-3) (3).

Kao endemska vrsta *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) uglavnom je ograničena na područje Sjeverne Amerike, iako neki podaci navode kako je nekoliko sojeva izolirano u Slovačkoj i Austriji. *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B) rasprostranjena je po cijeloj sjevernoj polutci, no u Europi su najčešće odgovorne za sve slučajeve tularemije. Osim u Europi tip B nedavno je izoliran i u Australiji (4,5). *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* identificirana je u određenim dijelovima središnje Azije (1). Sekvenciranje cijelog genoma dovelo je do definiranja podklasa tipa A i tipa B. Tip A može se podijeliti na 4 podklase: A1a, A1b, A2a, A2b, dok se tip B može podijeliti na: B.4, B.6, B.12, B.16. Različite podklase istog podtipa pronađene su na različitim geografskim područjima. Podklase se međusobno razlikuju ovisno o težini kliničke slike, dok se najvirulentnijim smatra tip A1b (4).

Dvije podvrste *F. tularensis*, tip A i tip B mogu uzrokovati bolest u ljudi stoga je bilo potrebno pronaći adekvatnu zaštitu od bolesti. Do danas je najviše istražen LVS (engl. *Live Vaccine Strain*), odnosno živo atenuirano cjepivo koje je derivat tipa B. LVS je visoko virulentan za miševе, dok za ljude nije, stoga se često koristi za eksperimentalna istraživanja virulencije roda *Francisella*. Prilikom istraživanja bolesti važna je identifikacija gena odgovornih za patogenezu i smrtnost, dok mutacije na određenom genu mogu zaštititi domaćina od smrtnog ishoda (6).

U oportunističke patogene ljudi spadaju *F. novicida*, *F. hispaniensis* i *F. philomiragia*. Osim navedenih rod *Francisella* uključuje i patogene riba *F. noatunensis*, *F. halioticida*,

endosimbionte krpelja *F. persica*, te *F. salina*, *F. uliginis*, *F. frigiditurris* koje su izolirane iz bočatih voda, klimatizacijskih sustava i rashladnih tornjeva (7). Povećanjem znanja i informacija o rodovima, vrstama i podvrstama *Francisella* koje žive u okolišu i u različitim životinjskim domaćinima, te uz mogućnost napredne tehnologije koja omogućavaju detekciju DNK ili proteina u konačnici dovodi do razlikovanja patogenih od ne patogenih sojeva *Francisella* za ljude (3).

1.2. Epidemiologija tularemije

Epidemiološki ili Vogralikov lanac sadrži 5 koraka koji moraju biti ispunjeni kako bi došlo do pojave, a zatim i širenja određene zarazne bolesti pa samim time i bolesti koju uzrokuje *F. tularensis*, a ona se naziva tularemija (8).

1.2.1. Izvor zaraze

Iako veliki broj životinjskih vrsta u okolišu mogu biti domaćini *F. tularensis*, točne vrste koje su posebno osjetljive na ovog uzročnika još nisu definirane. Pojedine vrste *F. tularensis* razlikuju se po svojoj virulenciji i ekologiji stoga i osjetljivost životinjskih vrsta kao domaćina ovisi o tome. Podaci vezani uz tularemiju u životinja su nepotpuni iz razloga što nisu točno definirane slučajne vrste i one vrste koje su rezervoari bolesti. U Sjevernoj Americi *Francisella* ima dva ekološka ciklusa a to su kopneni koji uglavnom obuhvaća zečeve i krpelje te vodeni ciklus koji obuhvaća poluvodene glodavce poput dabra, voluharica i komaraca. Održavanje *Francisella* u prirodi prvenstveno je povezano s glodavcima i zečevima (9).

Iz životinjskih vrsta kopnenog ciklusa izolirana je *F. tularensis* subsp. *tularensis* dok kod životinja vodenog ciklusa pronađena je *F. tularensis* subsp. *holarctica*. U različitim dijelovima svijeta pronađeni su različiti domaćini, koji mogu biti izvor zaraze, tako je na području bivšeg SSSR-u, *F. tularensis* subsp. *holarctica* izolirana iz životinja poput vodene i obične voluharice, hrčka, kućnog miša i krpelja vrste *Ixodes*. Nasuprot tome u Skandinaviji *F. tularensis* subsp. *holarctica* pronađena je u komarcima, običnom zecu, planinskim zečevima, europskom smeđem zecu i poljskoj voluharici, a u istočnoj i zapadnoj Europi pronađeni su kod zečeva, krpelja i obične voluharice. Uloga svake pojedine vrste u ekološkom ciklusu nije u potpunosti precizno i točno definirana, stoga mogu biti različita ili ograničena za određeno geografsko područje. Domaćini *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* za sada su nepoznati zbog malog broja

sojeva koji su do sada detektirani. Osim bolesnih životinja izvor zaraze mogu biti i uginule životinje ili zaklane životinje odnosno njihovi dijelovi poput vune, kože, dlake i mesa (9). *F. tularensis* subsp. *holarctica* može biti također izoliran iz vode ili tla. Iako se *F. novicida* smatra oportunističkim patogenom bolest se može javiti kod osoba smanjene imunološke otpornosti poput starijih osoba izloženih slanoj ili bočatoj kontaminiranoj vodi, ali nikada nije pronađena u člankonošcima ili životinjama poput drugih *F. tularensis*. Kao ne sporogena bakterija *F. tularensis* može biti u endobiozi sa slobodnoživućim amebama ili drugim protozoama koje u vodenom okolišu stvaraju ciste. Stvarajući ciste, slobodnoživuće amebe omogućavaju Francizelama da dulje prežive u okolišu, dulje nego što bi one preživjele same u ne sporogenom obliku te tako biti izvor dugotrajne kontaminacije (1).

1.2.2. Vektori i drugi načini prijenosa *F. tularensis*

Da su jelenske muhe, *Chrysops discalis* vektori u prijenosu *F. tularensis* otkrio je Edward Francis već 1921. godine. Veliki broj člankonožaca može biti inficirano s *F. tularensis*, no samo krpelji, komarci, jelenske muhe i obadi spadaju u vektore koji patogena mogu prenijeti na ljude (10). Člankonošci, posebice krpelji, značajni ulogu imaju u održavanju bakterije u okolišu, prenoseći *F. tularensis* između malih glodavaca (11). Obadi i jelenske muhe prilikom hranjenja domaćinu nanose bolan ugriz što dovodi do prekida hranjenja člankonožaca zbog obrane domaćina. Obadi i jelenske muhe u potrazi za novim domaćinom, kako bi nastavili hranjenje, tijekom kratkog vremena mogu uzrokovati akutna izbijanja tularemije. Jelenske muhe i obadi predstavljaju mehaničke vektore jer *F. tularensis* ne može u njima preživjeti tijekom duljeg vremenskog perioda, već se smatra kako bakteriju nose na svojem usnom aparatu. *F. tularensis* se može prenositi i putem komaraca koji se također poput obada i jelenskih muha smatraju mehaničkim prijenosnicima tularemije, te su sposobni samo prolazno prenijeti bolest u prirodi. Smatra se kako se uzročnik u organizam domaćina može unijeti i putem izmeta člankonošca tijekom njegovog hranjenja na domaćinu ili prilikom drobljenja komarca na koži, a osobito ako nakon toga dođe do trljanja ili grebanja površine kože na mjestu uboda. Pronađeno je da više vrsta komaraca uključujući i *Aedes* spp. može prenositi tularemiju. Tijekom epidemija tularemije *Aedes cinereus* i *Ochlerotatus excrucians* pronađeni su kao prirodno zaraženi komarci. Za razliku od prethodno navedenih vektora koji *F. tularensis* mogu prenijeti mehaničkim putem, krpelji se smatraju značajnim biološkim vektorima. Krpelji, osim što imaju mogućnost ugrizom prenijeti uzročnika između životinja i ljudi imaju i sposobnost

održavati uzročnika u okolišu tijekom duljeg vremenskog razdoblja, stoga se smatra i vjerojatnim rezervoarom *F. tularensis* (10). *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis* i *Amblyomma americanum* su tri vrste krpelja koje imaju najveću učestalost prijenosa tularemije na ljude (11).

Prilikom kontakta sa zaraženim tkivom životinja, bakterije *F. tularensis* vrlo lako se mogu prenijeti na kožu ljudi, što se najčešće događa tijekom lova. Također, nedovoljno termički obrađenim mesom zaraženih životinja uzročnik se može unijeti u organizam. Od ostalih načina izloženosti, *F. tularensis* se može širiti putem prašine ili aerosola, te konzumacijom vode koja može biti kontaminirana bakterijama ako je u kontaktu sa zaraženom životinjom (12). Nema dovoljno podataka da se bakterija može prenijeti s čovjeka na čovjeka (13).

Nadalje, vektori koji prenose *F. tularensis* međusobno se razlikuju po geografskom položaju i brojnošću njihovih domaćina. Prevladavajući način prijenosa *F. tularensis* u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD-u) su putem ugriza krpelja, nasuprot tome u sjevernim zemljama; Švedskoj, Finskoj i Rusiji komarci su identificirani kao glavni vektori koji prenose tularemiju na ljude. Konzumacijom hrane i vode koja je kontaminirana s *F. tularensis*, te kontakt sa zaraženom životinjom češći su načini prijenosa tularemije u srednjoj Europi (11).

1.2.3. Ulazna vrata infekcije

Mali broj bakterija *F. tularensis* u organizmu čovjeka izaziva infekciju. Bakterija u organizam može ući na nekoliko načina. Izravni kontakt kože i sluznica sa zaraženim tkivima, gastrointestinalnim putem, respiratornim putem odnosno udisanjem aerosola u kojemu se nalaze bakterije, te putem ugriza vektora (14).

1.2.4. Virulencija i infektivna doza

F. tularensis smatra se jednom od najinfektivnijih i najpatogenijih bakterija. Zbog svoje vrlo niske infektivne doze, velikog broja mogućih puteva ulaska u organizam, postojanosti u okolišu, nespecifičnih kliničkih znakova infekcije te također velike stope smrtnosti i morbiditeta, *F. tularensis* smatra se potencijalnim biološkim oružjem. Studije su pokazale razlike u virulenciji između podvrste *F. tularensis* subsp. *tularensis* i *F. tularensis* subsp

holarctica, ali i razlike između podtipova subsp. *tularensis*. Najvirulentnijim od tri podvrste za ljude i životinje smatraju se sojevi tipa A, kod kojeg infektivna doza 50 (ID₅₀) iznosi manje od 10 bakterija (15). Sojevi tipa A također se smatraju virulentnijim od tipa B. Soj A1b smatra se virulentnijim od A1a i A2, te uzrokuje veću stopu smrtnosti u mišjim modelima koji su u korelaciji s nalazima u ljudi (16). Navedeno istraživanje ističe kako je tip B vrlo zarazan za miševе i zamorce kod kojih je ID₅₀ manja od 10 bakterija unesenih intradermalno ili respiratornim putem, kod zečeva za zarazu subkutano potrebno je od 10⁶-10⁹ bakterija, a ljudi <10³ bakterija (15). Kod SCHU S4 soja, 1 - 4 bakterija, inokuliranih intradermalno predstavlja letalnu dozu 50 (LD₅₀) u miševa. SCHU S4 može izazvati infekcije opasne po život kod ljudi unosom 10 bakterija subkutano ili 25 bakterija inhalacijom (17).

1.2.4.1. Čimbenici virulencije

Kao dobro opisani čimbenici virulencije *F. tularensis* uključuju *Francisella* patogeni otok (FPO) (engl. *Francisella pathogenicity island*, FPI) za kojeg se smatra da kodira proteine koji čine sustav sekrecije tipa VI (T6SS). FPO je skup od 16 - 19 gena i nalazi se u svim vrstama i sojevima, a u dvije kopije nalazi se u *F. tularensis* koje su virulentne za ljude. *F. novicida* i *F. philomiragia* sadrže samo jednu kopiju FPO. Geni koji se nalaze unutar FPO važni su za bijeg *Francisella* iz fagosoma, razmnožavanje unutar makrofaga domaćina te izazivanje bolesti (17). Jedna od glavnih transkripcijskih jedinica je *iglABCD* te mutacija bilo kojeg gena dovodi do smanjenja rasta *Francisella* u makrofazima i satnicama miševa. Uz *iglABCD*, *pdpABCD* geni potvrđeni su kao potrebni za virulentnost Francizele. Konkretno *iglC* gen važan je za inhibiciju sazrijevanja fagosoma i za bijeg *Francisella* iz fagosoma domaćina. *iglD* gen važan je za unutarstaničnu replikaciju (18). *IglA* i *iglB* geni potrebni su za virulenciju i unutarstaničnu replikaciju (19). U drugoj velikoj transkripcijskoj jedinici važnu ulogu imaju *pdpA* i *pdpB* geni koji kodiraju proteine važne za virulenciju i unutar stanični rast. Također, transkripcijski regulatori *mglA* i *mglB* imaju važnu ulogu u rastu *F. tularensis* u makrofagima. Mutacije transkripcijskog faktora *mglA* dovodi do smanjenja regulacije ekspresije gena unutar i izvan FPO, također dolazi do smanjenja sposobnosti *Francisella* da inhibira sazrijevanje fagosoma te samim time i bijeg u citosol i daljnju replikaciju (18). *IglI* gen za kojeg je otkriveno da se izlučuje u citosolu stanice omogućuje Francizeli bijeg iz fagosoma i unutarstanični rast, citopatogenost te osim toga potreban je za aktivaciju inflammasoma i za virulenciju kod miševa (19).

Osim FPO, lipopolisaharid (LPS) spada u čimbenike virulencije *F. tularensis* te je odgovoran za održavanje cjelovitosti vanjske membrane, regulaciju propusnosti stanice i za izbjegavanje obrane domaćina odnosno otpornost na antitijela. LPS su molekule koje se mogu pronaći na vanjskoj membrani većine gram-negativnih bakterija. LPS kod *F. tularensis* kao i kod većine bakterija sastoji se od lipida A, jezgrinog oligosaharida 3-deoksi-D-mano-okt-2-ulozonska kiselina poznat pod nazivom Kdo, koji je vezan za lipid A i O-polisaharid poznat kao O-antigen. Lipid A kod *F. tularensis* za razliku od drugih bakterija prilično je slab stimulans urođenog imuniteta domaćina. Kako bi se domaćin mogao obraniti vrlo je važno prepoznavanje lipida A kao stranog. LPS se smatra odgovornim za gubitak virulencije i sporiji rast kod mutanti koje ga ne posjeduju. Kod *F. tularensis* LPS je specifičan i razlikuje se strukturno i kemijski uspoređujući ju s drugim bakterijama što dovodi do nedostatka imunološkog prepoznavanja domaćina (20).

Pili tipa IV važni su čimbenici virulencije kod mnogih gram-negativnih bakterija. Osim za virulenciju pili tipa IV služe za pokretljivost bakterija, adheziju, stvaranje biofilma i kolonizaciju domaćina. *F. tularensis*; *tularensis* (tip A), *holarctica* (tip B) i *F. novicida* imaju niz specifičnih varijacija u genima pili tipa IV. Smatra se kako je među različitim genima, gen *pilA* potreban za virulenciju Francizele tipa A i tipa B, te u bakterijama u kojima je on spontano deletiran uočena je smanjena virulencija (21).

U potencijalne i nedovoljno istražene čimbenike virulencije *F. tularensis* mogu se ubrojiti kapsula O-antigena i kompleks sličan kapsuli. Kapsula O-antigena građena je najčešće od polisaharida, te se smatra kako sojevi kojima nedostaje O-antigen i kapsula su osjetljiviji i oslabljeni u *in vivo* pokusima. Uvjeti rasta mogu imati važnu ulogu u ekspresiji kapsula, te se zato točna uloga koju kapsula ima u virulenciji *F. tularensis* nije u potpunosti razjašnjena (22).

1.2.5. Osjetljivost domaćina

Poput obrane od drugih bakterija, obrana domaćina od *F. tularensis* ovisi o staničnoj imunosti. Bolest uzrokovana *F. tularensis* subsp. *tularensis* i *holarctica* uočena je da se pojavljuje i kod ljudi koji nemaju prethodnih zdravstvenih problema. Infekcija s *F. novicida* vrlo je rijetka u ljudi, no bolest je prvenstveno zabilježena kod imunokompromitiranih pacijenata ili pacijenata koji su imali zdravstvenih problema. U oportunističke patogene uz *F. novicida* mogu se ubrojiti *F. hispaniensis* i *F. philomiragia*. Zbog nedovoljno podataka

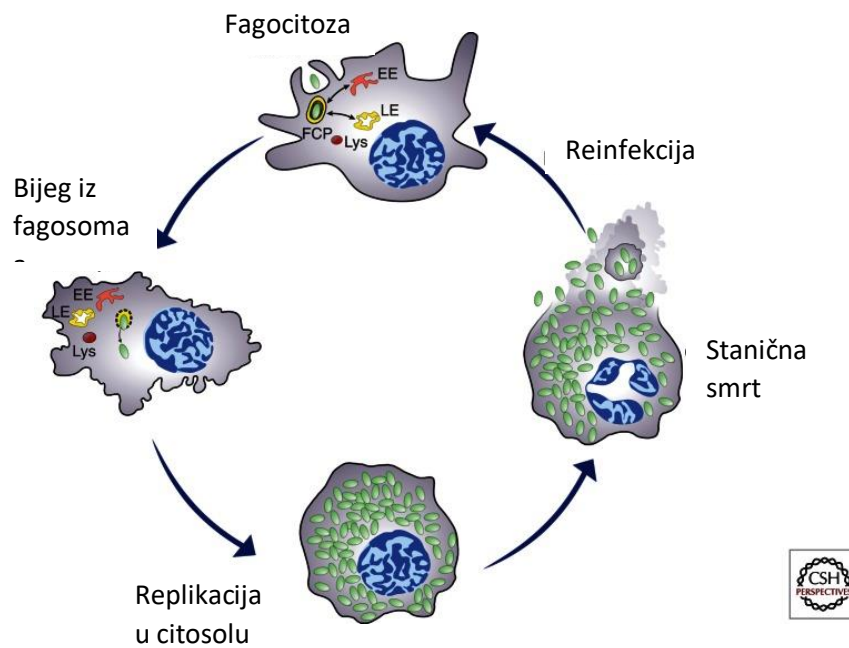
nemoguće je sa sigurnošću potvrditi da li dob, spol, genetika, osjetljivost domaćina ili neke druge osobine utječu na posljedice i izazivanje bolesti, već se može reći kako je za sada uglavnom razlika u virulenciji među sojevima odgovorna za izazivanje bolesti i težine kliničke slike u ljudi (23, 24).

1.3. Mehanizam patogeneze *F. tularensis*

Ključni element životnog ciklusa *Francisella* je mogućnost bakterije da uđe, preživi i replicira se unutar stanice domaćina. Francizele također imaju sposobnost da unutar stanice domaćina izbjegnu prepoznavanje i eliminaciju od strane imunološkog sustava. Makrofazi su ciljane stanice domaćina nakon što *Francisella* uđe u organizam domaćina. Makrofazi spadaju u skupinu fagocita, stanica imunološkog sustava i možemo ih pronaći po cijelom tijelu odnosno u svim organima i tkivima. U tkivu domaćina na mjestu izvora upale makrofazi brzo migriraju te imaju sposobnost fagocitiranja patogena, te oslobađanja aktivnih molekula poput citokina ili kemokina (25).

Kako bi se *Francisella* dalje replicirala važan je ulazak u stanice domaćina putem receptora koji dovode do stvaranja i sazrijevanja fagosoma koji je važna karika u uništavanju mikroorganizama. U početnoj fazi na membrani novo nastalog fagosoma nalazi se enzim nikotin adenin dinukleotid fosfat (NADPH oksidaza) koja stvara reaktivne kisikove spojeve (engl. Reactive oxygen species, ROS) koji imaju baktericidno djelovanje. *Francisella* ima strategiju ranog blokiranja aktivacije NADPH oksidaze pri čemu dolazi do remećenja proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva. Ovim mehanizmom *Francisella* uspijeva izbjeći rano ubijanje od strane fagosoma. Oponizacija bakterija, pa tako i Francizele uvelike pomaže u procesu fagocitoze. Da bi se opsonizirane bakterije unijele u makrofage važni su CR3 receptori, Fcγ receptori, receptori uklanjanja klase A (engl. scavenger receptor A, SR-A), nukleolin i plućni surfaktant protein A (engl. lung surfactant protein A, SP-A). Nakon unosa, bakterija se nalazi unutar fagosoma, fagosom koji sadrži *Francisella* (FCP) (26,27). Tijekom sazrijevanja, FCP dolazi u interakciju s ranim i kasnim endosomalnim markerima. Također, vakuolarna ATP-aza dovodi do zakiseljavanja fagosoma. Kratkotrajno zakiseljavanje fagosoma omogućava Francizeli bijeg u citosol (28). Daljnji tijek događaja upućivao bi na spajanje fagosoma sa lizosomom koji sadržava hidrolitičke enzime važne za razgradnju fagocitiranih tvari. Fuzija fagosoma i lizosoma se ipak ne događa iz razloga što Francizele nepoznatim mehanizmom ometaju FCP membranu. Također kao bitan preduvjet za bijeg *Francisella* iz

FCP-a pokazalo se njegovo kratko zakiseljavanje, jer inhibicijom vakuolarne ATP pumpe dolazi do odgođenog bijega. Fagosomski bijeg uključuje razgradnju lipidne membrane pri čemu bakterije uspijevaju „pobjeći“ u citoplazmu stanice gdje se odvija njihova daljnja replikacija. Nakon opsežne replikacije u citosolu dolazi do programirane stanične smrti i oslobađanja bakterija koje imaju mogućnost inficirati nove okolne stanice (26,27).



Slika 1. Model unutarstaničnog životnog ciklusa *Francisella*. Izvor: Jean Celli and Thomas C. Zahrt. *Mechanisms of Francisella tularensis Intracellular Pathogenesis. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*; 2013 Apr; 3(4): a010314. doi: 10.1101/cshperspect.a010314

1.4. Imunitet i odgovor domaćina na infekciju

Brojni infektivni agensi pa tako i *F. tularensis* mogu različitim putevima ući u organizam ljudi i životinja te uzrokovati bolest. U početku urođeni imunološki obrambeni mehanizmi dovode do sprječavanja kolonizacije mikroorganizama i posljedično nastanka infekcije. Kada *Francisella* uđe u organizam domaćina i prođe kroz epitelne barijere, bude prepoznata od strane makrofaga. U krvi čovjeka makrofagi nastaju iz monocita te napuštaju cirkulaciju i migriraju u tkiva duž cijelog organizma (29). Makrofagi sadržavaju brojne citosolne i membranske receptore koji mogu detektirati mikrobe i razlikovati ih od molekula domaćina. (30). *F. tularensis* ispoljava značajke atipičnog LPS-a. Nakon fagocitoze, makrofagi imaju sposobnost proizvoditi niz antibakterijskih tvari poput vodikovog peroksida (H_2O_2) i dušikova oksida (NO). *F. tularensis* je patogen koji ima mogućnost da zaobiđe urođenu imunološku obranu organizma (29). Važnu ulogu u komunikaciji između stanica domaćina imaju citokini. T-stanice i makrofazi dominantni su proizvođači citokina, malih proteina koje mogu izlučivati uz navedene i stanice poput limfocita, monocita i leukocita. Za regulaciju upalnih reakcija aktivirani makrofagi proizvode proupalne citokine poput IFN- γ (*engl.* Interferon gamma) čija je sinteza bila istražena u okviru ovog diplomskog rada, uz njega još se mogu ubrojiti i IL-1 β , IL-6 i TNF- α . Nasuprot proupalnih citokina, protuupalni citokini su molekule koje kontroliraju odgovor proupalnih citokina. Glavni protuupalni citokini uključuju antagonist receptora interleukina IL-1, IL-4, IL-10, IL-11 i IL-13. Sinteza IL-10 protuupalnog citokina nakon intradermalne infekcije, također je bila istražena u okviru ovog diplomskog rada. IL-10 ima izrazito jako protuupalno djelovanje, te tako potiskuje sintezu proupalnih citokina i smanjuje djelovanje proupalnih receptora. Citokini imaju mogućnost da djeluju na stanice koje ih izlučuju, na stanice koje su u blizini ali i na udaljenije stanice, stoga nije ne uobičajeno da više tipova stanica luče isti citokin ili da isti citokin djeluje na više vrsta stanica (31).

1.4.1. Interferon gamma (IFN- γ)

F. tularensis kao gram-negativni mikroorganizam u svojoj vanjskoj membrani sadržava LPS koji povećava lokalnu proizvodnju IFN- γ (32). CD4⁺ T stanice, CD8⁺ T stanice i NK stanice važne su u kontroli infekcije *F. tularensis* te ujedno su odgovorne za proizvodnju IFN- γ citokina (33). Prepoznavanje patogena od strane makrofaga dovodi do stvaranja različitih proupalnih citokina uključujući i IL-12 citokin i drugih kemokina (32). Kemokini su proteini

niske molekularne težine čija je uloga aktivacija i usmjeravanje leukocita na mjesto infekcije (31). Kemokini mogu privlačiti i NK stanice na mjesto infekcije, dok će IL-12 potaknuti proizvodnju IFN- γ iz istih. IFN- γ poznat je po svojoj ulozi u zaštiti od unutarstaničnih patogena, te samim time i u kontroli unutarstanične replikacije virulentnih i avirulentnih sojeva *F. tularensis in vitro*. Tijekom *in vivo* infekcije IFN- γ dovodi do pojačane osjetljivosti imunološkog sustava te samim time i do pojačanog odgovora na patogene. Makrofagi bivaju aktivirani od strane IFN- γ kako bi uništili fagocitirane mikroorganizme. IFN- γ može potaknuti makrofage da luče višu razinu proupalnih citokina, a nižu razinu protuupalnih citokina povećavajući tako mikrobicidnu aktivnost. Također, jedan od mehanizama kojima IFN- γ djeluje na obranu od patogena je i aktiviranje puteva koji stvaraju reaktivne dušikove (RNS) i kisikove (ROS) spojeve (32).

1.4.2. Interleukin 10 (IL-10)

Aktivacijom proupalnih citokina organizam se brani od mikroorganizama, no prekomjerna sinteza u konačnici može dovesti do štetnih posljedica za domaćina stoga se paralelno s proupalnim citokinima otpuštaju i protuupalni citokini. Ako iz nekog razloga dođe do smanjene proizvodnje protuupalnog citokina IL-10 u organizmu može doći do pojačanog ili preuveličanog upalnog odgovora, što neki patogeni mogu iskoristiti i stvarati trajne infekcije (34). IL-10 može imati različitu ulogu u infekciji *F. tularensis*. Istraživanja navode kako miševi kojima nedostaje IL-10 citokin pokazuju veću smrtnost nakon plućne infekcije s *F. tularensis* subsp. *holarctica* soj LVS. IL-17 je proupalni citokin koji također ima važnu ulogu u zaštiti domaćina od plućne infekcije s *F. tularensis* subsp. *holarctica* soj LVS, no njegova proizvodnja je regulirana s IL-10, stoga u nedostatku IL-10, u inficiranim miševima može doći do povećane proizvodnje proupalnih citokina što dovodi do negativnih posljedica za domaćina (35). Nasuprot plućne infekcije kod kožnih infekcija, IL-10 ograničava ekspresiju IL-17 koji ima potencijalno zaštitni utjecaj kod kožne tularemije (36). Također IL-10 može imati i negativni utjecaj na proizvodnju i proliferaciju IFN- γ tako što direktno djeluje na CD4⁺ T stanice (32). Različita ekspresija IL-10 može imati i različitu ulogu u zaštiti od tularemije (36). Stoga za učinkoviti imunološki odgovor potrebna je ravnoteža između proupalnih i protuupalnih odgovora (34).

1.5. Tularemija

George Walter McCoy istraživao je bubonsku kugu u vjeverica i štakora koja se pojavila 1906. godine nakon razornog potresa u San Franciscu. Iako su promjene koje su se događale u vjeverica upućivale na kugu, izolacija specifičnog patogena nije uspjela. Nakon određenog broja pokušaja s različitim hranjivim podlogama uspješno je izoliran novi mikroorganizam koji su prvo nazvali *Bacterium tularense* po okrugu Tulare gdje je bakterija prvi puta i izolirana. Edward Francis 1919. uspješno je uspio izolirati bakteriju iz ljudske krvi. Njegova daljnja istraživanja dovela su do razvitka metoda dijagnostike, te do opisivanja slučajeva koji su se događali u laboratoriju, stoga je bakteriju klasificirao kao laboratorijsku opasnost (37).

Epidemije kod životinja, pogotovo glodavaca ili zečeva često se javljaju paralelno s izbijanjem tularemije u ljudi. Razlog tomu može se pripisati povećanom broju ovih vrsta što u konačnici dovodi do veće mogućnosti kontakta čovjeka sa zaraženom životinjom. Osim toga povezujući moguće puteve prijenosa s pojavljivanjem bolesti može se reći kako je bolesti češće pronađena kod ljudi koji rade i žive u blizini životinja i poljoprivrednih površina. Stoga, osobe s većim rizikom od obolijevanja uključuju lovce, poljoprivrednike, veterinare, laboratorijske djelatnike (38). Bolest se najčešće javlja u ruralnim područjima, no dosadašnja istraživanja pokazala su da *Francisella* ima veliku zemljopisnu rasprostranjenost (18).

1.5.1. Klinička slika tularemije u ljudi

U većini zemalja sjeverne hemisfere bolest se javlja endemski. Kliničke manifestacije bolesti prvenstveno ovise o putu ulaska bakterije u organizam (37). Osim o putu ulaska u organizam ovisi i o soju pa tako *F. tularensis*; tip A i tip B imaju široku varijaciju u ozbiljnosti bolesti. Tip A može uzrokovati teže oblike bolesti, dok tip B uzrokuje blaže oblike bolesti (1). Inkubacija može trajati sve do 21 dana te najčešće započinje iznenadno visokom temperaturom i simptomima sličnim gripi. Najčešći oblik bolesti je ulceroglandularna tularemija, a uzrokovana je ugrizom krpelja ili komaraca. Ovaj oblik često se javlja i kod lovaca nakon direktnog kontakta sa zaraženom životinjom. Na mjestu infekcije dolazi do pojavljivanja čira na koži, otečenosti limfnih žlijezda, vrućica, zimica, glavobolja i iscrpljenost. Glandularni oblik manifestira se istim simptomima poput ulceroglandularne samo što se ne pojavljuje čir na koži. Nadalje, tularemija se aerosolom ili prstima može prenijeti u oko izazivajući okuloglandularni oblik bolesti. Od simptoma mogu se pojaviti bol u oku, crvenilo oka i

konjunktivitis. Ako se *Francisella* u organizam unese putem kontaminirane hrane ili vode dolazi do promjene na sluznici usta i ždrijela, te povećanje limfnih čvorova na vratnoj regiji što upućuje na orofaringealni oblik bolesti. Udisanjem aerosola koji sadržava bakterije *Francisella* javlja se respiratorna tularemija koja je ujedno i najteži oblik ove bolesti. Tifoidni oblik tularemije klasificira se kod nepoznatog ulaska bakterije u organizam (37,38). Tifoidna tularemija nema rane znakove niti simptome bolesti (14).

1.5.2. Tularemija u životinja

Tularemija je zoonoza, bolest koja se primarno pojavljuje u životinja no u određenim situacijama može doći do prijenosa uzročnika na ljude. Napredak novih tehnologija dovelo je do boljeg razumijevanja tularemije u životinja (9). *F. tularensis* izolirana je iz više od 300 različitih vrsta sisavaca, gmazova, riba, ptica, vodozemaca i beskralježnjaka. Glavni vektori u prijenosu *F. tularensis* su krpelji i komarci pa se i većina ljudskih infekcija najviše događa u ljetnim mjesecima što se može povezati s njihovom većom brojnošću i većom mogućnošću kontakta (39). Najveći udio izolata *F. tularensis* pronađen je kod glodavaca i zečeva. Sve učestalijom pojavom tularemije u divljih životinja mogla bi pogodovati povećanjem oboljenja domaćih životinja. Kod domaćih životinja tularemija se javlja u ovaca, zečeva, konja, svinja, pasa, a mačke su posebno osjetljive na *F. tularensis* te su važan čimbenik tularemije u ljudi. Osim toga postoje 2 moguća puta kojima se mačke mogu zaraziti. Mačke su aktivni lovci miševa stoga je mogućnost da *F. tularensis* u svoj organizam unesu oralno, dok je druga mogućnost prijenos patogena putem krpelja. Osim mačaka u Norveškoj je prijavljen slučaj tularemije u pasa koji je bio izložen zaraženom planinskom zecu tijekom lova (40). Kod zečeva i glodavaca iz okoliša klinički znakovi tularemije nisu dobro opisani, postoje samo podaci o eksperimentalno zaraženih životinja kod kojih se javlja slabost, groznica, čirevi i apsces. Kod ovaca bolest se javlja sezonski i povezana je sa većom infestacijom krpelja. Od simptoma javljaju se otežano disanje, groznica, dijareja (41).

1.6. Dijagnostika tularemije

Tularemija je rijetka bolest koju je teško dijagnosticirati. Razlog tomu je kasno javljanje pacijenata liječniku zbog blagih simptoma, nespecifičnosti kliničke slike i kasne sumnje

liječnika na tularemiju, ali i mogućnost da se simptomi zamjene s drugim bolestima koje se češće javljaju u populaciji. Kod oboljelih osoba bakterija se najčešće izolira iz hemokulture. Moguće je, ali puno rjeđe bakteriju izolirati iz kožnih čireva, eksudata ždrijela, biopsije limfnih čvorova, uzoraka sputuma i cerebrospinalne tekućine (4). *F. tularensis* je bakterija koja za rast zahtjeva posebno obogaćen hranjivi medij. Iako ima mogućnost rasta na čokoladnom agaru, Thayer-Martin agaru, BCYE (engl. Buffered Charcoal Yeast Extract) i CHAB (engl. Cysteine Heart Agar with Blood) agaru, najbolji rast pokazuje na krvnom agaru obogaćenom cisteinom. Rast na hranjivoj podlozi vidljiv je 24 do 72 sata nakon inkubacije. *F. tularensis* raste na 37 °C, a slabo na nižim temperaturama što ju razlikuje od *Yersinia pestis*, *F. philomiragia* i *F. novicida* koje vrlo dobro rastu pri temperaturi od 28 °C (42). Zbog otežane kultivacije sve se više dijagnostika tularemije fokusira na serološke metode. Klinička slika u ljudi najčešće se potvrđuje odgovorom antitijela na *F. tularensis* antigen. Metode koje se koriste uključuju test aglutinacije u epruvetama (TAT), mikro aglutinacijski test (MAT), test lateks aglutinacije (LAT), imunofluorescentni test (IFA), enzimski povezani imunosorbentni test (ELISA). Svi serološki testovi trenutno imaju ograničenja u osjetljivosti i specifičnosti, stoga je potrebno ispitati nove metode koje će pomoći u potvrdi dijagnoze kod bolesnika s nespecifičnom kliničkom slikom (4). Također za dijagnosticiranje moguće je koristiti i sve se više koristi PCR metoda koja se temelji na vezivanju početnica za specifične gene koji primjerice kodiraju proteine vanjske membrane ili lipoprotein vanjske membrane. Poboľšanjem PCR metode omogućeno je i razlikovanje dvije podvrste *F. tularensis* subsp. *tularensis* i *holarctica* (42).

1.7. Liječenje i prevencija

U liječenju tularemije trenutno se koristi nekoliko antibiotika uključujući fluorokinolone, tetracikline, aminoglikozide. No, zbog moguće toksičnosti nekih od ovih lijekova za djecu i trudnice, recidiva bolesti te neuspjeha u liječenju potrebno provesti daljnja istraživanja u razvoju novih terapija. Uz primjenu antibiotika važna je i paralelna aktivnost urođenog imunološkog odgovora koji može pomoći u liječenju bolesti (43).

Poznatom činjenicom da se *F. tularensis* može se prenositi vektorima poput krpelja i komaraca mjere prevencije obuhvaćale bi korištenje repelenata i nošenje odjeće koja pokriva ekstremitete kako bi se izbjegla mogućnost uboda člankonožaca koji sišu krv (44). Prevencija orofaringealne tularemije uključuje izbjegavanje konzumacije ne prokuhane i ne dezinficirane vode te zaštita izvora vode od kontakta sa životinjama poput glodavaca. Također hranu je

potrebno zaštititi od mogućeg kontakta sa glodavcima koji hranu mogu onečistiti putem izmeta (45). Potrebno je provesti dobru termičku obradu mesa divljih zečeva prije konzumacije. Potrebno je izbjegavati kupanje i plivanje u površinskoj vodi za koju postoji mogućnost da je bila u kontaktu sa uginulom životinjom oboljela od tularemije (46). Respiratorna i ulceroglandularna tularemija mogu se prevenirati koristeći rukavice tijekom obrade mesa tijekom lova, pranje ruku nakon kontakta sa domaćim i divljim životinjama, redovito pregledavanje domaćih životinja na znakove bolesti, zatvaranjem vrata traktora tijekom obrade poljoprivrednih površina omogućava se smanjena mogućnost ulaska bakterije u organizam putem prašine ili aerosola (45).

Izravan kontakt kože i sluznica sa infektivnim materijalima, izlaganje aerosolu ili infektivnim kapljicama tijekom laboratorijskih istraživanja moguće je spriječiti koristeći zaštitnu odjeću uključujući laboratorijsku kutu, nepropusne rukavice i maske za lice (44). Zbog različitog mogućeg puta ulaska bakterije u organizam prvenstveno je potrebno da su laboratorijski zaposlenici informirani da u uzorku koji se analizira može biti prisutna *Francisella* pri čemu je onda potrebno pridržavati se smjernica o biološkoj sigurnosti. Istraživanja sa virulentnim sojevima *F. tularensis* subsp. *tularensis* potrebno je obavljati u BSL-3 laboratorijima (13).

F. tularensis osjetljiva je na sredstva za dezinfekciju uključujući 1 % natrijev hipoklorit, 70 % etanol, glutaraldehid i formaldehid (45).

1.8. Razvoj cjepiva

Trenutno liječenje tularemije antibioticima je vrlo učinkovito u ranoj fazi infekcije. Međutim, nespecifični simptomi i kasna identifikacija mogu dovesti do odgode korištenja odgovarajuće terapije. Također veliku zabrinutost predstavlja i mogućnost pojave rezistencije na trenutno dostupne antibiotike. Osim toga, zbog vrlo niske infektivne doze te mogućnosti širenja putem aerosola, što može uzrokovati veliku smrtnost, *F. tularensis* klasificira se kao potencijalno biološko oružje (47). Sve navedene činjenice dovele su do velikog interesa oko *F. tularensis*, a naročito oko razvitka cjepiva. Razvitak cjepiva protiv *Francisella* seže još iz 1940-ih. Korištene su cijele ubijene stanice *F. tularensis* no takvi pripravci u većini slučajeva nisu pružali potpunu zaštitu (18). Značajan napredak u razvoju cjepiva dogodio se 1950-ih kada su znanstvenici u bivšem Sovjetskom Savezu zajedno s američkim znanstvenicima razvili živo

atenuirano homologno cjepivo protiv tularemije. LVS je izveden iz virulentnog soja *F. tularensis* subsp. *holarctica*. LVS je ostao virulentan za životinje, a kod ljudi je pružio nepotpunu zaštitu od tularemije čiji je izvor zaraze bio aerosol koji je sadržavao *F. tularensis* subsp. *tularensis* (48). Iako je LVS pružao dobru zaštitu kod niske infektivne doze problem je u ne dovoljno znanja o mogućnosti vraćanja virulencije i varijabilna imunogenost. Istraživanja su se provodila i na *F. novicida*, iako avirulentna za ljude nije se pokazala kao prikladna osnova za cjepivo, jer ne uspijeva inducirati zaštitni imunološki odgovor protiv virulentnih sojeva *F. tularensis*. Za sada živo atenuirano cjepivo predstavlja najbolju opciju kao cjepivo protiv tularemije. Kako bi se moglo licencirati potrebno je dokazati da bakterija ima ograničenu sposobnost replikacije i preživljavanja *in vivo*, tako da potakne zaštitni imunološki odgovor ali bez uzrokovanja stvarne bolesti (49).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi ulogu *iglI* gena *in vivo* praćenjem preživljavanja C57BL/6 miševa i određivanjem broja bakterija u jetri, slezeni i plućima nakon intradermalne infekcije mutantom *iglI*, u usporedbi s *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS i komplementantom *iglI/iglI*. Kako bi bolje razumjeli ulogu *iglI* mutante u patogenezi tularemije, istraživanje je bilo usmjereno i na ispitivanje imunološkog odgovora domaćina, sintezom IFN- γ i IL-10 citokina, *in vivo* na C57BL/6 miševima nakon infekcije s *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, mutantom *iglI* i njenom komplementantom *iglI/iglI*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Bakterijski soj

U svrhu eksperimentalnog rada korišteni su bakterijski soj *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (engl. *Live Vaccine Strain*), mutanta $\Delta igII$ i njena komplementanta *igII/igII*. Bakterije su uzgajane na obogaćenom čokoladnom agaru (engl. *Gonococci Agar Base*, GC) tijekom 48 sati pri temperaturi od 37 °C uz 5 % CO₂.

3.2. Miševi

U *in vivo* pokusima korišteni su 8 - 9 tjedana stari C57BL/6 miševi kupljeni iz Jackson laboratorija (Bar Harbor, SAD). Sve životinje su uzgajane i smještene u Vivariju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci prema Institucionalnim i Nacionalnim smjernicama.

3.3. Priprema bakterijske suspenzije za infekciju miševa

Bakterijska suspenzija je pripremljena pomoću brisnog štapića u sterilnoj fiziološkoj otopini. Spektrofotometrom je određen točan broj bakterija pri valnoj duljini od 580 nm. Kako bi dobili koncentraciju od 10⁹ bakterija/ml potrebno je da O.D (engl. *optical density*) bude 1, što je utvrđeno prethodnim istraživanjima. Razrjeđivanjem početne koncentracije dobile su se željene koncentracije potrebne za daljnja istraživanja. Točan broj vijabilnih bakterija provjerio se nakapavanjem deseterostrukih razrjeđenja na obogaćenu GC hranjivu podlogu i brojanjem kolonija nakon 48 sati inkubacije na 37 °C uz 5 % CO₂.

3.4. Postupak infekcije miševa

Za praćenje preživljavanja, 10 miševa po skupini inficirano je intradermalno s *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, mutantom $\Delta igII$ i komplementantom *igII/igII* dozama 5 x 10⁴, 5 x 10⁵, 5 x 10⁶ bakterija/mišu. Inficirani miševi praćeni su svakodnevno kroz 15 dana. Na

temelju rezultata preživljavanja miševa određena je srednja smrtna doza od koje umire 50 % životinja (engl. *median lethal dose*; LD₅₀).

Kako bi odredili broj bakterija u tkivu jetre, slezene i pluća inficirana su 3 miša po skupini. Za postizanje infekcije, *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, mutanta $\Delta igII$ i njena komplementanta *igII/igII* su se inokulirale intradermalno dobivenom LD₅₀ dozom (5×10^4 bakterija/mišu).

3.5. Postupak određivanja broja bakterija u organima miševa

Nakon intradermalne infekcije dozom 5×10^4 bakterija/mišu, miševi su 6, 24, 48 i 72 sata nakon infekcije humano žrtvovani perfuzijom 0,9 %-tnom otopinom NaCl-a u dubokoj anesteziji otopina ksilazina (10 mg/kg) i ketamina (100 mg/kg). Nakon toga su izolirana tkiva jetre, slezene i pluća. Nakon što su miševima odstranjeni organi, pola organa se koristilo za određivanje broja bakterija, a pola organa se pripremiло za qRT-PCR metodu.

Za određivanje broja bakterija u organima, tkiva su usitnjena i homogenizirana kroz mrežice s 5 ml sterilne fiziološke otopine. Homogenati organa su zatim centrifugirani na 4000 G tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon što je supernatant odbačen, homogenat organa je resuspendiran u 1 ml sterilne hladne destilirane vode i pušten 10 minuta u hladnjaku na +4 °C. Nakon hlađenja napravljena su deseterostruka razrijeđenja u mikrotitar pločicama s 96 jažica. Deseterostruka serijska razrijeđenja nakapana su na obogaćenu GC hranjivu podlogu koja se zatim inkubirala 48 sati na temperaturi od 37 °C i atmosferi s 5 % CO₂.

Za pripremu tkiva za qRT-PCR, pola tkiva organa zaleđeno je u tekućem dušiku pomoću Tissue Tek-a i spremljeno u zamrzivač na -80 °C do daljnjeg istraživanja.

3.6. Izolacija ribonukleinske kiseline (RNA) iz tkiva jetre, slezene i pluća

Prema protokolu za izolaciju RNA potrebno je izrezati zaleđena tkiva jetre, slezene i pluća veličine 20 mikrona na kriostat uređaju. Svaka pojedina skupina tkiva zatim je stavljena u Eppendorf tubicu od 1,5 ml. U tubice je zatim potrebno dodati 800 μ l Trizol reagensa (Trizol Reagent Ambion 15596026, Made in USA) koji služi za liziranje stanica te sve pažljivo resuspendirati uz pomoć pipete. Nakon što je uzorak inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi

potrebno je dodati 160 μ l kloroforma. Nakon dodatka kloroforma, tubice je potrebno 15 sekundi snažno protresti te ostaviti inkubirati 2-3 minute na sobnoj temperaturi. Tijekom inkubacije stvaraju se dvije faze. Uzorak je nadalje potrebno centrifugirati na 12.000 okretaja/minuti kroz 10 minuta na + 4 °C. Nakon centrifugiranja tekuću-gornju fazu potrebno je prebaciti u novu tubicu te staviti na led. U tekuću-gornju fazu koju smo prebacili u novu tubicu zatim se dodaje 400 μ l izopropanola te se tubice lagano 3-4 puta izokrenu rukama. Uzorak se inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije slijedi centrifugiranje na 12.000 okretaja/minuti kroz 10 minuta na + 4 °C. Supernatant se nakon centrifugiranja ispipetira i odbaci, a RNA pelet se ispere sa 800 μ l 75 % etanola koji je razrijeđen s molekularnom vodom, odnosno dietilpirokarbonat, DEPC vodom. DEPC kovalentno veže i inaktivira enzime ribonuklease (RNase), koji razgrađuju RNA. Uzorak se zatim vorteksira i centrifugira na 7500 okretaja/minuta kroz 5 minuta na + 4 °C. Supernatant je potrebno ispipetirati i odbaciti a pelet se suši na zraku 10 minuta. Pelet koji sadrži RNA zatim se resuspendira s 60 μ l DEPC vode i inkubira 10 minuta na 55-60 °C. RNA je potrebno pohraniti na temperaturi od -80 °C.

3.7. Mjerenje koncentracije RNA i transkripcija RNA u cDNA

Koncentracija RNA mjeri se spektrofotometrijski nakon što se RNA razrijedi sa sterilnom DEPC vodom u omjeru 1 : 40. Nakon toga se transkripcija u cDNA provodi pomoću kita QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputama proizvođača.

3.8 Kvantitativna reverzna transkripcija u stvarnom vremenu s lančanom reakcijom polimeraze (engl. Real – Time Quantitative Reverse Transcription -Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)

mRNA (engl. Messenger-RNA) također poznata kao i glasnička ribonukleinska kiselina, stvara se u jezgri stanice, a komplementarna je s jednim od lanaca deoksiribonukleinske kiseline (DNA) (50). DNA sadrži informaciju za proizvodnju proteina, stoga mRNA sadrži kopiju informacija (51). mRNA je jedna od vrsta RNA koje imaju mogućnost da napuste staničnu jezgru i odu u citoplazmu. Citoplazma predstavlja mjesto gdje će se informacija s

mRNA uz pomoć ribosoma prevesti u proteine. Ribosomi imaju mogućnost kretanja duž mRNA čitajući genetski kod gdje svaki triplet baza predstavlja jednu aminokiselinu koje će u konačnici tvoriti proteine (50). Proteini osim što imaju veliku ulogu u izgradnji našeg organizma, imaju ulogu i u zaštiti organizma od bolesti (51).

PCR predstavlja metodu kojom se enzimatski umnaža molekula DNA *in vitro*, pri čemu je potrebno poznavati sekvencu koju želimo umnožiti. (52). Kada je početna molekula od interesa mRNA koristi se qRT-PCR. Kod ove metode mRNA od interesa prvo se mora prevesti u komplementarnu DNA (cDNA) uz pomoć reverzne transkriptaze. cDNA zatim služi kao šablona za qRT-PCR (53).

Za qRT-PCR metodu koristio se kit Taq Man Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, SAD) i početnice Taqman® gene expression assays (Applied Biosystems, Foster City, SAD) prema uputstvu proizvođača. Cijela metoda izvodila se na ledu. Koristile su se brze optičke RT-PCR pločice za reakciju s 96 jažica (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Analizirani su IFN- γ (Mm01168134_m1), IL-10 (Mm00439614_m1). Uzorci su analizirani u triplikatu. Uzorci su analizirani na uređaju 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Uvijeti termičkog ciklusa uključuju početni korak denaturacije cDNA molekule na 95 °C tijekom 10 minuta i 40 ciklusa na 95 °C tijekom 15 sekundi i 60 °C tijekom 1 minute.

3.9 Statistička obrada podataka

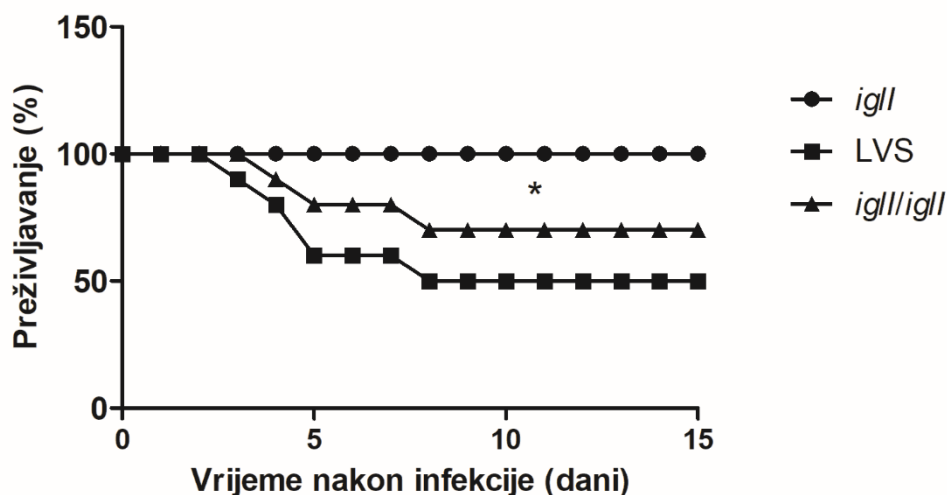
Za izradu grafova i računanje statistike koristio se program GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, SAD). Normalnost raspodjele svih parametara se provjerila pomoću Kolmogorov-Smirnovljev testa. Za uzorke s normalnom raspodjelom koristio se Student t-test. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati preživljavanja C57BL/6 miševa nakon intradermalne infekcije

4.1.1. Praćenje preživljavanja C57BL/6 miševa nakon intradermalne infekcije dozom 5×10^4 bakterija/mišu.

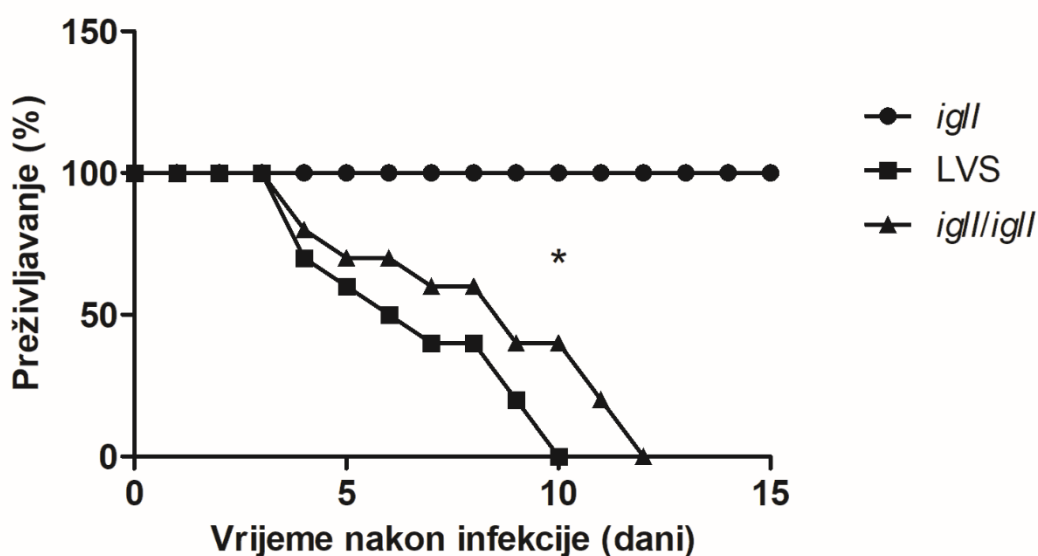
Intradermalnom infekcijom s mutantom *ΔiglI*, dozom od 5×10^4 bakterija/mišu nakon 15 dana praćenja svi su miševi preživjeli, odnosno stopa preživljavanja miševa bila 100 %. Nadalje, kontrolna skupina inficirana sojem LVS dozom od 5×10^4 bakterija/mišu unutar promatranog vremena dovela je do preživljavanja 50 % miševa. Rezultati upućuju kako doza od 5×10^4 bakterija/mišu predstavlja letalnu dozu 50 (LD₅₀) za skupinu inficiranih miševa s divljim sojem. Infekcija miševa komplementantom *iglI/iglI* dovela je do preživljavanja 70 % miševa tijekom promatranog vremena (Slika 2.).



Slika 2. Preživljavanje C57BL/6 miševa nakon intradermalne infekcije s *F. tularensis* sojem LVS, mutantom *ΔiglI* te komplementantom *iglI/iglI* s dozom od 5×10^4 bakterija/mišu. Inficirani miševi pratili su se 15 dana. * $p < 0,0001$ statistički značajna razlika između preživljavanja miševa inficiranih *ΔiglI* mutantom i *F. tularensis* sojem LVS.

4.1.2. Praćenje preživljavanja C57BL/6 miševa nakon intradermalne infekcije dozom 5×10^5 bakterija/mišu.

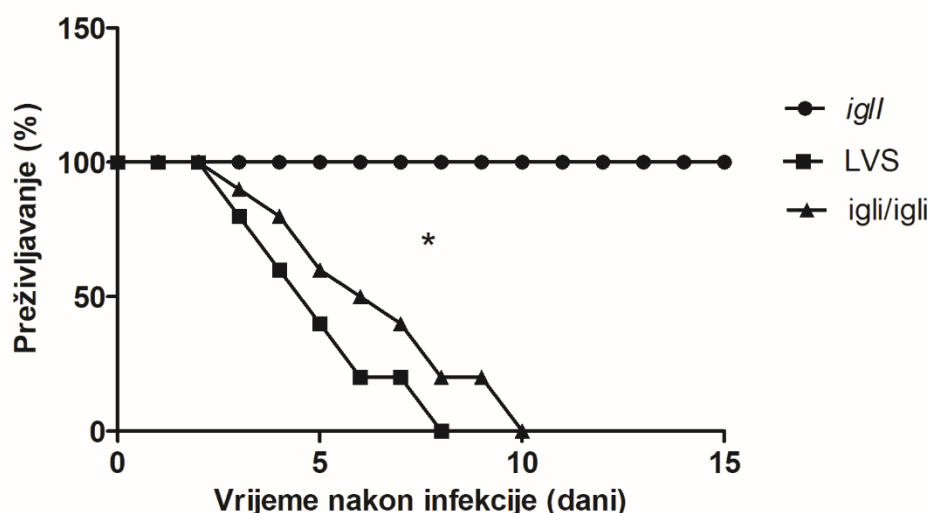
Infekcija miševa s dozom od 5×10^5 bakterija/mišu, dovela je do preživljavanja svih miševa koji su bili inficirani s mutantom $\Delta igII$. Nasuprot tome, miševi inficirani divljim sojem LVS također dozom od 5×10^5 bakterija/mišu počeli su umirati četvrtog dana, dok desetog dana praćenja, više nije bilo preživjelih miševa. Također, infekcija komplementarnom $igII/igII$ uzrokovala je umiranje miševa četvrtog dana praćenja, dok 12. dana praćenja nije bilo preživjelih miševa (Slika 3.).



Slika 3. Preživljavanje C57BL/6 miševa nakon intradermalne infekcije s *F. tularensis* soj LVS, mutantom $\Delta igII$ te komplementarnom *igII/igII* s dozom od 5×10^5 bakterija/mišu. Inficirani miševi pratili su se 15 dana. * $p < 0,0001$ statistički značajna razlika između preživljavanja miševa inficiranih $\Delta igII$ mutantom i *F. tularensis* soj LVS.

4.1.3. Praćenje preživljavanja C57BL/6 miševa nakon intradermalne infekcije dozom 5×10^6 bakterija/mišu.

S najvećom testiranom dozom bakterija, miševi inficirani $\Delta iglI$ mutantom imali su 100 % preživljavanje. Nasuprot tome, kontrolna skupina koja je bila inficirana divljim sojem LVS i skupina miševa inficiranih komplementarnom *iglI/iglI* počela je umirati trećeg dana od infekcije. Miševi inficirani divljim sojem LVS i komplementarnom *iglI/iglI*, osmog odnosno desetog dana imali su stopu preživljavanja 0 %. Jedina razlika je u šestom danu kada je bilo 20 % preživjelih miševa inficiranih divljim sojem LVS, dok je udio preživjelih miševa inficiranih komplementarnom *iglI/iglI* bio 50 % (Slika 4.).

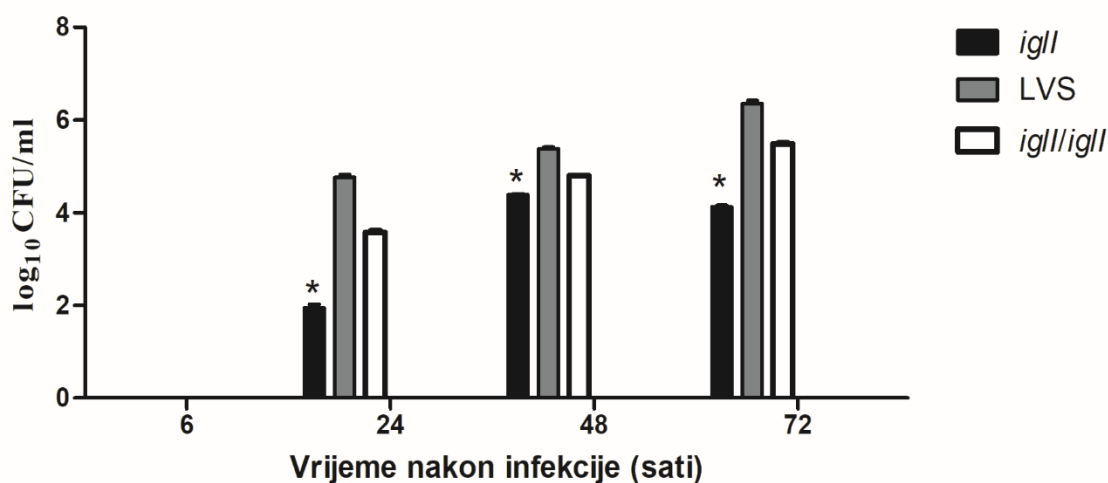


Slika 4. Preživljavanje C57BL/6 miševa nakon intradermalne infekcije s *F. tularensis* soj LVS, mutantom $\Delta iglI$ te komplementarnom *iglI/iglI* s dozom od 5×10^6 bakterija/mišu. Inficirani miševi pratili su se 15 dana. * $p < 0,0001$ statistički značajna razlika između preživljavanja miševa inficiranih $\Delta iglI$ mutantom i *F. tularensis* soj LVS.

4.2. Rezultati razmnožavanja bakterija u tkivu jetre, slezene i pluća

4.2.1. Razmnožavanje bakterija u tkivu jetre

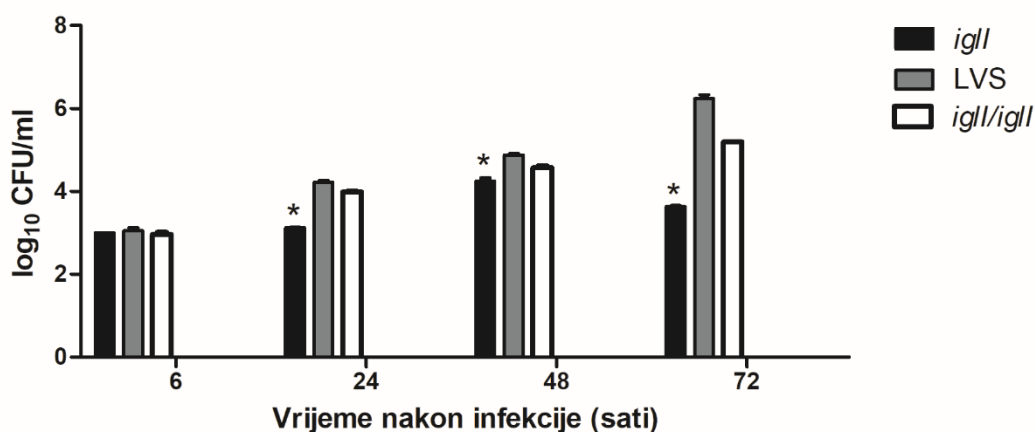
Iz priloženih rezultata vidljivo je kako 6 sati nakon infekcije nije došlo do rasta bakterija u tkivu jetre. Nakon 24 sata od infekcije primjećuje se porast broja svih bakterija. *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS 24 sata nakon infekcije ima statistički značajno ($p=0,0005$) veći porast u odnosu na mutantu $\Delta igII$. Tijekom 48 sati od infekcije može se uočiti kako je došlo do značajnijeg porasta broja bakterija mutante $\Delta igII$ uspoređujući ju s predhodnim vremenom od 24 sata. Pozitivan rast broja svih bakterija uočen je u tkivu jetre 72 sata nakon infekcije. Rezultati pokazuju kako divlji soj LVS ima statistički značajno veći porast broja bakterija 48 ($p=0,0008$) i 72 ($p=0,0006$) sata nakon infekcije u usporedbi s mutantom $\Delta igII$ (Slika 6.).



Slika 5. Kinetika rasta *F. tularensis* soj LVS, mutante $\Delta igII$ i komplementante *igII/igII* u tkivu jetre C57BL/6 miševa. Miševi su inficirani intradermalno dozom 5×10^4 bakterija/mišu. Nakon 6, 24, 48 i 72 sata od infekcije jetra je izolirana, propasirana u 5 ml fiziološke otopine, centrifugirana i resuspendirana u 1 ml destilirane vode. Nakon 10 minuta na $+4$ °C, pripremla su se deseterostruka razrijeđenja suspenzije nasadena su na čokoladni agar kako bi se odredio broj unutarstaničnih bakterija. *Statistički značajne razlike između $\Delta igII$ mutante i *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

4.2.2. Razmnožavanje bakterija u tkivu slezene

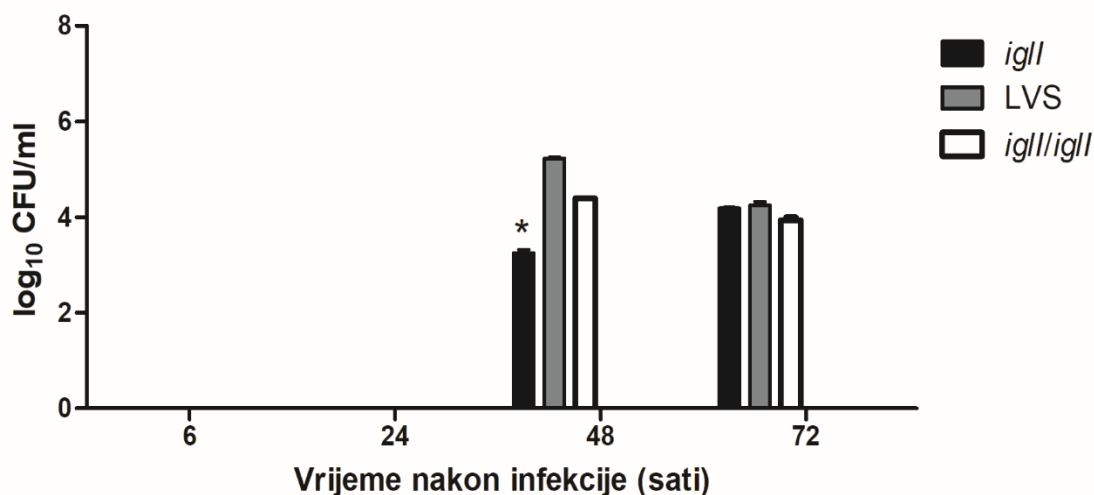
Nakon provedene metode rada vidljivo je da je u tkivu slezene došlo do rasta bakterija 6, 24, 48, 72 sata nakon infekcije. *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, mutanta ΔigI i komplementanta *igII/igII* uspješno se razmnožavaju u tkivu slezene. Iz rezultata je uočljivo kako je porast broja bakterija mutante ΔigI statistički značajno smanjen 24 ($p=0,0007$), 48 ($p=0,0078$), 72 sata ($p=0,0016$) u usporedbi s *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Vidljivo je kako je 72 sata nakon infekcije došlo do blagog pada broja bakterija mutante ΔigI , dok je broj bakterija LVS te komplementante *igII/igII* u porastu uspoređujući s prethodnim vremenima (Slika 5.).



Slika 6. Kinetika rasta *F. tularensis* soj LVS, mutante ΔigI i komplementante *igII/igII* u tkivu slezene C57BL/6 miševa. Miševi su inficirani intradermalno dozom 5×10^4 bakterija/mišu. Nakon 6, 24, 48 i 72 sata od infekcije slezena je izolirana, propasirana u 5 ml fiziološke otopine, centrifugirana i resuspendirana u 1 ml destilirane vode. Nakon 10 minuta na $+4^\circ\text{C}$, pripremila su se deseterostruka razrijeđenja suspenzije i nasadena su na čokoladni agar kako bi se odredio broj unutarstaničnih bakterija. *Statistički značajne razlike između ΔigI mutante i *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

4.2.3. Razmnožavanje bakterija u tkivu pluća

Iz priloženih rezultata vidljivo je kako 6 i 24 sata nakon infekcije nije došlo do porasta broja bakterija u tkivu pluća. Do porasta bakterija u tkivu pluća dolazi 48 sati nakon infekcije gdje je broj bakterija mutante $\Delta igII$ statistički značajno manje ($p=0,0007$) uspoređujući sa sojem LVS. 72 sata od infekcije vidljivo je kako je došlo do smanjenja broja bakterija soja LVS i komplementantne $igII/igII$ u odnosu na 48 sati, mutanta $\Delta igII$ raste no nema statistički značajne razlike u njihovom broju u odnosu na divlji soj LVS (Slika 7.).



Slika 7. Kinetika rasta *F. tularensis* soj LVS, mutante $\Delta igII$ i komplementante $igII/igII$ u tkivu pluća C57BL/6 miševa. Miševi su inficirani intradermalno dozom 5×10^4 bakterija/mišu. Nakon 6, 24, 48 i 72 sata od infekcije pluća su izolirana, propasirana u 5 ml fiziološke otopine, centrifugirana i resuspendirana u 1 ml destilirane vode. Nakon 10 minuta na $+4^\circ\text{C}$, pripremla su se desetorostruka razrijeđenja suspenzije nasadena su na čokoladni agar kako bi se odredio broj unutarstaničnih bakterija. *Statistički značajna razlika između $\Delta igII$ mutante i *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

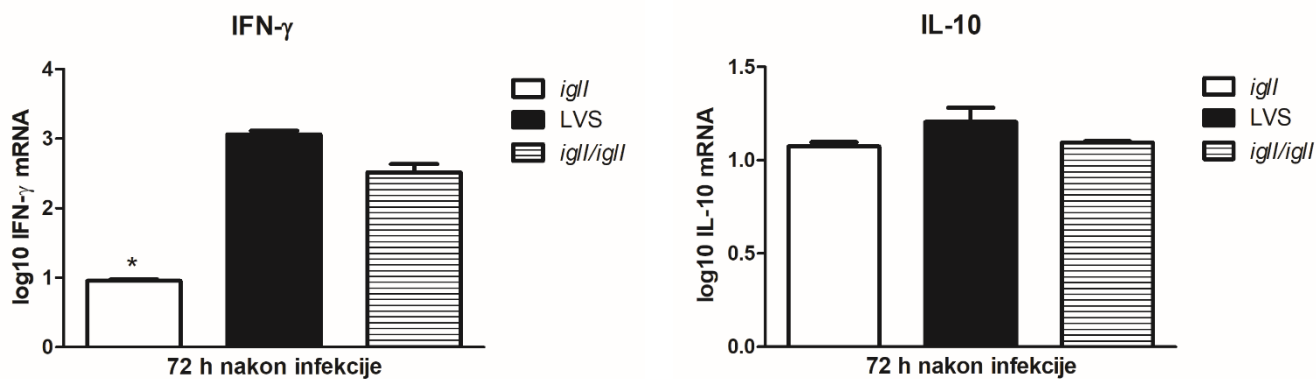
4.3. Razina mRNA citokina IFN- γ i IL-10 u tkivu jetre, slezene i pluća

Kako bi bolje razumjeli ulogu *iglI* mutante u patogenezi tularemije, ispitali smo imunološki odgovor domaćina, sintezom citokina *in vivo* na C57BL/6 miševima nakon infekcije s *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, mutantom Δ *iglI* i njenom komplementantom *iglI/iglI* u dozi 5×10^4 bakterija/mišu. Razine citokina analizirane su u jetri, slezeni i plućima 72 sata nakon infekcije uz pomoć qRT-PCR metode.

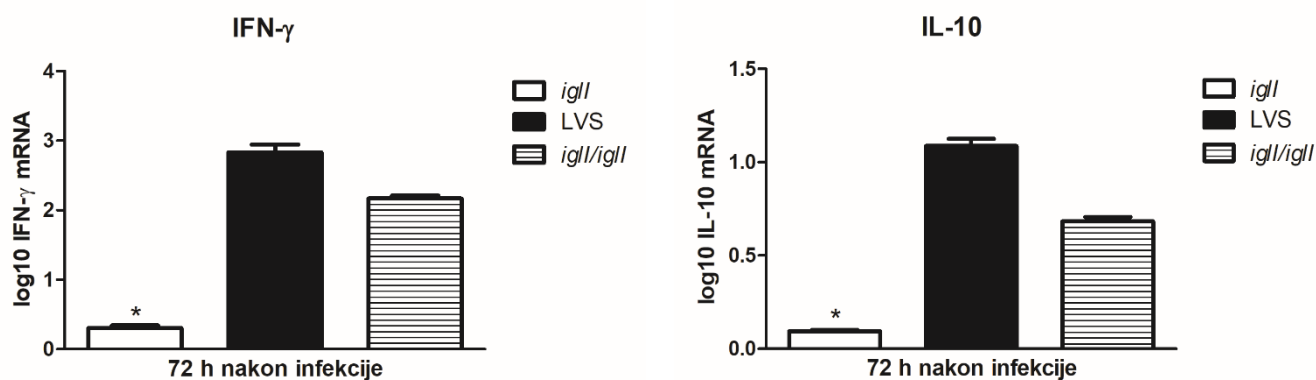
U jetri C57BL/6 miševa inficiranih mutantom Δ *iglI* uočene su statistički značajno ($p = 0,0004$) niže razine mRNA proupalnog citokina IFN- γ u usporedbi s divljim sojem LVS (Slika 8.). Također, 72 sata nakon infekcije razine mRNA prupalnog citokina IFN- γ pokazale su se statistički značajno niže i u tkivu slezene ($p = 0,0011$) (Slika 9.) i u tkivu pluća ($p = 0,0008$) (Slika 10.) u usporedbi s divljim sojem LVS.

Nakon 72 sata od infekcije nedostatak *iglI* gena doveo je do statistički značajno ($p = 0,0008$) niže razine protuupalnog citokina IL-10 u tkivu slezene (Slika 9.) i pluća ($p = 0,0005$) (Slika 10.) uspoređujući s divljim sojem LVS. Suprotno, u tkivu jetre nije došlo do statistički značajne razlike u razinama mRNA protuupalnog citokina IL-10 uspoređujući s divljim sojem LVS (Slika 8.)

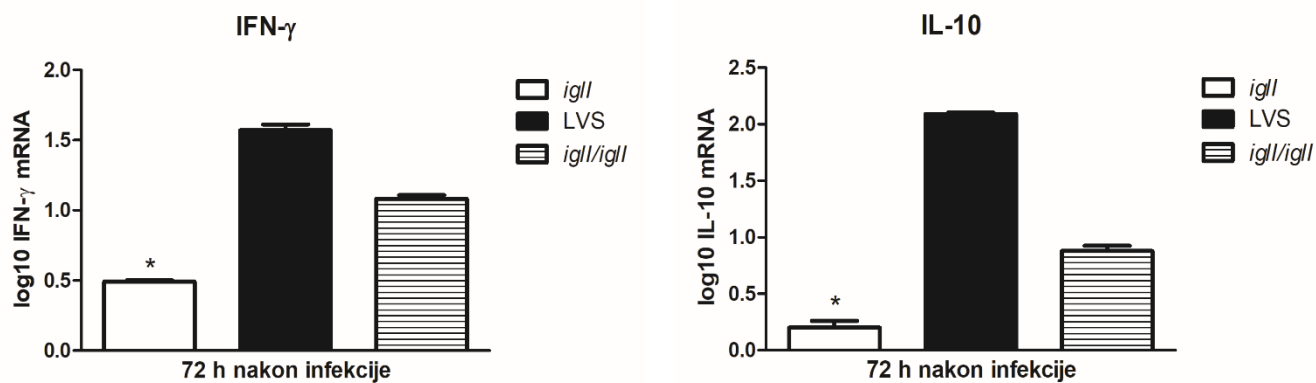
72 sata nakon infekcija *F. tularensis* LVS potaknula je proizvodnju citokina u svim skupinama tkiva koje su se promatrale. Uspoređujući razinu citokina nakon infekcije mutantom *iglI* i komplementantom *iglI/iglI* možemo reći kako komplementanta povećava razinu IFN- γ i IL-10 citokina u jetri, slezeni i plućima tijekom promatranog vremena. Komplementanta *iglI/iglI* ukazuje kako je *iglI* gen odgovoran za poticanje proizvodnje obrambenog mehanizma urođenog imunološkog sustava te da je vraćanje *iglI* gena mutanti *F. tularensis* soj LVS potaknulo na povećanu sintezu proupalnih IFN- γ i protuupalnih citokina IL-10 u svim ispitivanim skupinama tkiva. Također, iz priloženih rezultata vidljivo je kako je *iglI* mutanta najviše potaknula proizvodnju IL-10 u tkivu jetre 72 sata nakon intradermalne infekcije za razliku od ostalih ispitivanih organa.



Slika 8. Razina mRNA citokina IFN- γ i IL-10 u jetri miševa 72 sata nakon infekcije s *F. tularensis* soj LVS, mutantom $\Delta iglI$ i njenom komplementatom *iglI/iglI*. *Rezultati prikazuju statistički značajnu razliku u sintezi citokina IFN- γ u jetri miševa inficiranih mutantom *iglI* i *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.



Slika 9. Razina mRNA citokina IFN- γ i IL-10 u slezeni miševa 72 sata nakon infekcije s *F. tularensis* soj LVS, mutantom $\Delta iglI$ i njenom komplementatom *iglI/iglI*. *Rezultati prikazuju statistički značajnu razliku u sintezi citokina IFN- γ i IL-10 u slezeni miševa inficiranih mutantom *iglI* i *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.



Slika 10. Razina mRNA citokina IFN- γ i IL-10 u plućima miševa 72 sata nakon infekcije s *F. tularensis* soj LVS, mutantom Δ *iglI* i njenom komplementatom *iglII/iglI*. *Rezultati prikazuju statistički značajnu razliku u sintezi citokina IFN- γ i IL-10 u tkivu pluća miševa inficiranih mutantom *iglI* i *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Razina od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom

5. RASPRAVA

F. tularensis subsp. *holarctica* LVS često se koristi kao model u istraživanju procjene učinkovitosti cjepiva, unutarstanične patogeneze ali i za interpretaciju ljudskog imunološkog odgovora na infekciju. Najvažnija karika u preživljavanju *Francisella* u stanicama domaćina je njezina sposobnost da pobjegne iz fagosoma i replicira se unutar citosola makrofaga. Smatra se kako više molekularnih mehanizama mora biti pokrenuto kako bi *Francisella* imala takvu sposobnost da izbjegne urođeni imunološki odgovor makrofaga (19).

Iako patogenost *F. tularensis* nije u potpunosti shvaćena, dosadašnja istraživanja upućuju kako je za virulenciju bakterije odgovoran FPI. *IgI* gen kao jedan od gena koji se nalaze unutar FPI bio je dio istraživanja ovog diplomskog rada. Vrlo je malo podataka koji se mogu pronaći vezano uz *in vivo* istraživanja koja uključuju *igI* mutantu i *F. tularensis* subsp. *holarctica* soj LVS te razmnožavanje istih u tkivu pluća, jetre i slezene.

Cilj istraživanja bio je proučiti ulogu *igI* gena *in vivo* praćenjem preživljavanja i određivanjem broja bakterija u organima nakon intradermalne infekcije C57BL/6 miševa mutantom *igI* u usporedbi s divljim sojem *F. tularensis* soj LVS te komplementantom *igI/igI*. Rezultati pokazuju kako je preživjavanje C57BL/6 miševa nakon intradermalne infekcije svim ispitivanim dozama mutantom *igI* bilo 100% uspoređujući s divljim sojem LVS tijekom 15 dana praćenja. Ovakvi rezultati mogu se usporediti s istraživanjem koje je provedeno *in vitro* na stanicama makrofaga. Soj kojemu je nedostajao *igI* gen nije rastao unutar J774 stanica makrofaga dok je komplementanta *igI* dovela do ponovnog rasta unutar makrofaga. Također, FPI kod *F. tularensis* dijeli homologiju s nekim od proteina koji su kodirani unutar sustava sekrecije tipa VI (engl. *Type VI Secretion Systems*, T6SS) poput VgrG. Za izlučivanje *igI* unutar makrofaga potreban je VgrG i drugi faktori FPI (19). T6SS nalazi se kod mnogih gram-negativnih bakterija te je mehanizam koji bakterijama pomaže u borbi protiv drugih bakterijskih vrsta ali i u kolonizaciji novog područja. T6SS ima različitu ulogu ovisno o načinu života tog organizma uključujući virulenciju i antibakterijsku aktivnost (54). Kod bakterija poput *Vibrio cholerae* i *Pseudomonas aeruginosa* koje su izvanstanične bakterije, T6SS služi prvenstveno u obrani bakterije odnosno izlučivanju toksina kako bi se npr. *P. aeruginosa* suprotstavio drugim gram-negativnim bakterijama. Suprotno od navedenih *F. tularensis* je unutarstanična bakterija kojoj je T6SS potreban za bijeg iz fagosoma, replikaciju u citosolu stanice domaćina te virulenciju (17). Iako još nisu dovoljno točno i precizno definirane sve funkcije *igI* gena, dosadašnja istraživanja govore kako je važan za funkcioniranje i stvaranje

T6SS te uz prethodno navedeno, virulenciju i bijeg iz fagosoma u citosol, važan je i za aktivaciju urođenog imunološkog odgovora domaćina (55). Pregledom literature rezultate možemo usporediti i s jednim *in vivo* istraživanjem gdje su C57BL/6 miševi inficirani mutantom *iglI* i divljim sojem LVS intradermalno dozom od 2×10^8 CFU. Korištena doza u ovom istraživanju dovela je do 100 % smrtnosti miševa inficiranih divljim sojem, dok niti jedan miš koji je intradermalno inficiran mutantom *iglI* nije umro tijekom 20 dana praćenja. Također u istraživanju se navodi kako 60 % miševa inficiranih komplementantom *iglI* nije preživjelo (56). Iako u navedenom istraživanju nije korištena ista doza bakterija prilikom intradermalne infekcije miševa, možemo reći kako i pri većim infekcijskim dozama od onih korištenih u ovom diplomskom radu nije došlo do promjene u preživljavanju miševa inficiranih intradermalno mutantom *iglI*, što je dokaz kako je *iglI* gen potreban za virulenciju *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Iz naših rezultata je također vidljivo kako se povećanjem doze vrijeme smrti miševa inficiranih divljim sojem i komplementantom smanjivao.

Nadalje određivan je i broj bakterija u tkivu jetre, slezene i pluća miševa 6, 24, 48, 72 sata nakon intradermalne infekcije s LD₅₀ (5×10^4 bakterija/mišu) koja je prethodno određena. U svim navedenim organima divlji soj LVS se razmnožavao, također i *iglI* no u usporedbi s LVS statistički značajno smanjeno. Rezultati jednog sličnog istraživanja sukladni su ovdje dobivenim gdje je 72 sata nakon infekcije *iglI* kolonizirao slezenu no znatno manje nego LVS, te su podaci slični i za tkivo jetre (56). Možemo reći kako je broj bakterija u organima usporediv i s rezultatima testa preživljavanja miševa, naime povećana replikacija bakterija divljeg soja u svim ispitivanim organima što je vidljivo u rezultatima dovelo je do veće smrtnosti inficiranih miševa u odnosu na mutantu *iglI* i komplementantu *iglI/iglI*.

Da bi se organizam sisavaca obranio od moguće infekcije potrebno je aktivirati urođeni imunološki odgovor čiji mehanizam uključuje fagocitozu te posljedično tomu i razgradnju mikroorganizma unutar lizosoma. Kako bi preživjeli unutar organizma domaćina unutarstanične bakterije razvile su različite strategije kojima izbjegavaju stapanje fagosoma s lizosomom; npr. *Listeria* i *Shigella* razvile su sposobnost bijega u citoplazmu nakon razgradnje membrane fagosoma, *Coxiella* ima sposobnost da preživi kiselo okruženje koje se stvara nakon fuzije fagosoma i lizosoma. Kod primarne infekcije unutarstaničnim bakterijskim patogenima važnu ulogu ima IFN- γ , citokin urođenog imunološkog odgovora (57). IFN- γ je glavni u aktivaciji makrofaga koji su inficirani unutarstaničnim patogenima što dovodi do ograničavanja rasta patogena unutar stanica i također pokreće proizvodnju dušikovog oksida (iNOS). *F. tularensis* ima za cilj da potakne supresiju oslobađanja IFN- γ kako bi zaobišla

makrofage kao primarni obrambeni sustav (58). Kod mnogih unutarstaničnih patogena poput *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii* i *Mycobacterium tuberculosis*, IFN- γ ima važnu ulogu u kontroli infekcije (57). Slično drugim unutarstaničnim bakterijama, kod miševa inficiranih intradermalno s *F. tularensis* LVS razvija se urođeni imunološki odgovor što je vidljivo iz dobivenih rezultata. qRT-PCR-om određivana je razina IFN- γ u tkivu jetre slezene i pluća miševa inficiranih intradermalno s mutantom *iglI*, divljim sojem LVS i komplementantom *iglI/iglI*. Dobiveni rezultati pokazuju kako je sinteza IFN- γ citokina statistički smanjena u svim analiziranim skupinama tkiva nakon infekcije s mutantom *iglI* u usporedbi s *F. tularensis* LVS. U ljudskim stanicama soj LVS inducira upalne odgovore dok primarni mehanizam virulencije kod podvrsta *tularensis* smatra se izbjegavanje stimulacije brzih proupalnih odgovora. Iz dostupne literature vidljivo je kako je za preživljavanje infekcije s virulentnijim SchuS4 sojem potrebno djelovanje IFN- γ (33). Put infekcije također može imati utjecaj u aktivaciji imunološkog odgovora, tako se može vidjeti u navedenoj literaturi kako je intradermalna infekcija miševa sojem LVS dovela do značajno veće proizvodnje IFN- γ T-stanica u plućima i slezeni, nego nakon intranazalne infekcije (58). Da bi se organizam obranio od prekomjerne proizvodnje proupalnih citokina, važna je paralelna aktivacija protuupalnih citokina. U nedostatku protuupalnih citokina, IL-10, u organizmu domaćina može doći do preuveličanog upalnog odgovora na mikroorganizme (34). Osim toga, kod pojedinih unutarstaničnih patogena poput *Mycobacterium tuberculosis* i *Listeria monocytogenes* pokazalo se kako su miševi kojima nedostaje IL-10 imali veću zaštitu od infekcije (35). *F. tularensis* je specifična unutarstanična bakterija kod koje uloga IL-10 nije u potpunosti razjašnjena. Ovdje navodimo naše rezultate koji pokazuju kako se nakon intradermalne infekcije s mutantom *iglI* razina IL-10 citokina nije statistički značajno razlikovala od razine citokina u jetri kod miševa inficiranih sojem LVS. Nasuprot tome razina IL-10 citokina se statistički značajno razlikuje između tkiva slezene i pluća miševa inficiranih intradermalno *iglI* mutantom i sojem LVS. *Francisella* je razvila sposobnost ranog izbjegavanja i potiskivanja aktivnosti imunološkog odgovora vrlo rano nakon infekcije. IL-10 iako još ne dovoljno istražen pokazuje varijancije u svom djelovanju. Naime, dosadašnja istraživanja su otkrila kako odsutnost aktivnosti IL-10 šteti u borbi protiv plućne infekcije, dok njegova prisutnost povećava otpornost na kožnu infekciju. Ovakvi podaci ukazuju da učinci IL-10 ovise i o mjestu infekcije (36). Pregledom drugih studija vidljivo je kako *F. tularensis* LVS ima tendenciju poticanja proizvodnje IFN- γ i IL-10 citokina u tkivima jetre, slezene i pluća. Naši rezultati vezani uz *F. tularensis* soj LVS u skladu su s rezultatima pronađenim u dostupnoj literaturi koje pokazuju kako je IFN- γ eksprimiran u svim organima ali najviše u jetri, dok je kao

značajna iznimka bio IL-10 koji je najviše razine pokazivao 72 sata nakon infekcije u plućima (60). Pretragom literature trenutno nisu dostupni podaci koji su provedeni na usporedbi mutante *iglI* i *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS i mjerenje razine IFN- γ i IL-10 citokina stoga su se naši rezultati mogli samo djelomično usporediti s drugim istraživanjima.

Rezultati ovoga rada upućuju na to kako *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS može inducirati imunološki odgovor u infekciji *in vivo*, te da su u nedostatku *iglI* gena razine proupalnih i protuupalnih citokina smanjene. Također, možemo reći kako se *iglI* mutanta zbog nedostatka gena nije mogla replicirati unutar makrofaga vjerojatno zbog nemogućnosti bijega iz fagosoma u usporedbi s divljim sojem. Nadalje, *F. tularensis* kako bi olakšala svoj unutarstanični život potiskuje aktivnost makrofaga da luči citokine te je sposobna modulirati mnoge razine imunološkog odgovora domaćina. Također, možemo reći kako se povećanjem broja unutarstaničnih bakterija *F. tularensis* subsp. *holarctica* soj LVS povećava i količina sintetiziranih citokina u organima inficiranih miševa, odnosno povećanjem broja bakterija organizam se svojim urođenim imunološkim odgovorom brani od infekcije.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata eksperimentalnog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

- U svim je analiziranim organima bilo statistički značajno smanjeno razmnožavanje mutante *iglI* u usporedbi s divljim sojem LVS što je usporedivo s rezultatima preživljavanja miševa
- Komplementanta mutante *iglI/iglI* pokazala je da se vraćanjem gena, vratila i virulencija bakterije
- *IglI* gen potreban je za unutarstaničnu replikaciju *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS u stanicama sisavaca
- Intradermalna infekcija miševa s *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS potaknula je sintezu IFN- γ i IL-10 citokina u svim ispitivanim organima. Nedostatak *iglI* gena doveo je do smanjene replikacije bakterije te samim time i imunološkog prepoznavanja i niže sinteze IFN- γ u jetri, slezeni i plućima te IL-10 citokina u tkivu slezene i pluća. Zanimljivo je kako jedino u tkivu jetre nije došlo do statistički značajne razlike u razinama IL-10 citokina u usporedbi s divljim sojem LVS
- Dobiveni rezultati pokazuju da je *iglI* gen odgovoran za virulenciju *F. tularensis* subsp. *holarctica* soj LVS *in vivo*

7. LITERATURA

1. Telford S.R, III and Goethert H.K. Ecology of *Francisella tularensis*. *Annu Rev Entomol.* 2020 Jan 7; 65: 351–372. doi: 10.1146/annurev-ento-011019-025134
2. Semić V., Brezovec M., Lazarić I. i Šantić M. Ekologija, domaćini i vektori bakterije *Francisella tularensis*. *Medicina* 2009, Vol. 45, No. 2, p. 154-159
3. Challacombe J. F., Petersen J. M. , La Verne Gallegos-Graves, 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 Feb 1; 83(3): e02589-16. doi: 10.1128/AEM.02589-16
4. Maurin M. *Francisella tularensis*, Tularemia and Serological Diagnosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 512090. doi: 10.3389/fcimb.2020.512090
5. Fulton K. M., Zhao X., Petit M. D, Kilmury S. L. N., Wolfrain L. A., House R. V., et al. Immunoproteomic analysis of the human antibody response to natural tularemia infection with Type A or Type B strains or LVS vaccination. *Int J Med Microbiol.* 2011 Nov; 301(7): 591–601. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.07.002
6. Hobbs B. E., Matson C. A., Theofilou V. I., Webb T. J., Younis R. H., and Barry E. M. Deletion Mutants of *Francisella* Phagosomal Transporters FptA and FptF Are Highly Attenuated for Virulence and Are Protective Against Lethal Intranasal *Francisella* LVS Challenge in a Murine Model of Respiratory Tularemia. *Pathogens.* 2021 Jul; 10(7): 799. doi: 10.3390/pathogens10070799
7. Thelaus J., Lundmark E., Lindgren P., Sjödin A., and Forsman M. *Galleria mellonella* Reveals Niche Differences Between Highly Pathogenic and Closely Related Strains of *Francisella* spp. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 05 June 2018 | <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00188>
8. Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Vogralikov lanac; 20. May 2021. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/en/vogralikov-lanac-2/> (pristupljeno: 07. travanj. 2022.)
9. Pilo P. Phylogenetic Lineages of *Francisella tularensis* in Animals. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 31 July 2018 | <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00258>
10. Petersen J. M., Mead P. S., and Schriefer M. E. *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Vet Res.* 2009 Mar-Apr; 40(2): 07. doi: 10.1051/vetres:2008045
11. Akimana C., and Kwaik Y. A. *Francisella*–Arthropod Vector Interaction and its Role in Patho-Adaptation to Infect Mammals. *Front Microbiol.* 2011; 2: 34. doi: 10.3389/fmicb.2011.00034

12. Centers for Disease Control and Prevention. Tularemia – transmission. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/tularemia/transmission/index.html> (pristupljeno: 08. travanj. 2022.)
13. WHO. World Health Organization Guidelines on Tularaemia. Dostupno na: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43793/9789241547376_eng.pdf;jsessionid=33D899335B81ACF09C6B39C22E41B0B3?sequence=1 (pristupljeno 08. travanj. 2022.)
14. Snowden J., and Simonsen K. A. Tularemia. StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430685/>
15. Rowe H. M. and Huntley J. F. From the Outside-In: The *Francisella tularensis* Envelope and Virulence. Front. Cell. Infect. Microbiol., 23 December 2015 | <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00094>
16. Molins C. R., Delorey M. J., Yockey B. M., Young J. W., Belisle J. T., Schriefer M. E., et. al. 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
17. Clemens D. L., Lee B. and Horwitz M. A. The *Francisella* Type VI Secretion System. Front. Cell. Infect. Microbiol., 23 April 2018 | <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00121>
18. Pechous R. D. , McCarthy T. R., and Zahrt T. C. Working toward the Future: Insights into *Francisella tularensis* Pathogenesis and Vaccine Development. Microbiol Mol Biol Rev. 2009 Dec; 73(4): 684–711. doi: 10.1128/MMBR.00028-09
19. Barker J. R., Chong A. , Wehrly T. D., Yu J., Rodriguez S. A., Liu J. et. al. The *Francisella tularensis* Pathogenicity Island Encodes a Secretion System that is required for Phagosome Escape and Virulence. Mol Microbiol. 2009 Dec; 74(6): 1459–1470. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06947.x
20. Okan N. A. and Kasper D. K. The atypical lipopolysaccharide of *Francisella*. Carbohydr Res. 2013 Aug 30; 378: 79–83. doi: 10.1016/j.carres.2013.06.015
21. Salomonsson E. N, Forslund A. L., and Forsberg A. Type IV Pili in *Francisella* – A Virulence Trait in an Intracellular Pathogen. Front Microbiol. 2011; 2: 29. doi: 10.3389/fmicb.2011.00029
22. Freudenberg Catanzaro K. C., and Inzana T. J. The *Francisella tularensis* Polysaccharides: What Is the Real Capsule?. Microbiol Mol Biol Rev. 2020 Mar; 84(1): e00065-19. doi: 10.1128/MMBR.00065-19

23. Kingry L. C., and Petersen J. M. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 13 March 2014 | <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00035>
24. Cowley S. C., and Elkins K. L. Immunity to *Francisella*. *Front. Microbiol.*, 16 February 2011 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00026>
25. Kierdorf K., Prinz M., Geissmann F., and Gomez Perdiguero E. Development and function of tissue resident macrophages in mice. *Semin Immunol.* 2015 Dec; 27(6): 369–378. doi: 10.1016/j.smim.2016.03.017
26. Celli J. and Zahrt T. C. Mechanisms of *Francisella tularensis* Intracellular Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Apr; 3(4): a010314. doi: 10.1101/cshperspect.a010314
27. Chong A. and Celli J. The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Front. Microbiol.*, 28 December 2010 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00138>
28. Ozanic M., Marecic V., Knezevic M., Kelava I., Stojkova P., Lindgen L. et. al. The type IV pili component PilO is a virulence determinant of *Francisella novicida*. *PLoS One.* 2022; 17(1): e0261938. doi: 10.1371/journal.pone.0261938
29. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. The front line of host defense (2-1 – 2-4). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27105/>
30. Krocova Z., Macela A. and Kubelkova K. Innate Immune Recognition: Implications for the Interaction of *Francisella tularensis* with the Host Immune System. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 16 October 2017 | <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00446>
31. Zhang J., and An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007 Spring; 45(2): 27–37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e
32. Schroder K., Hertzog P. J. , Ravasi T. , Hume D. A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*; 02 October 2003 <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
33. Crane D. D., Scott D. P., Bosio C. M. Generation of a Convalescent Model of Virulent *Francisella tularensis* Infection for Assessment of Host Requirements for Survival of Tularemia. *Plos One*; March 12, 2012 | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033349>
34. Iyer S. S. and Cheng G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol.* 2012; 32(1): 23–63.

doi: 10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30

35. Slight S. R., Monin L., Gopal R., Avery L., Davis M., Cleveland H. et.al. IL-10 Restrains IL-17 to Limit Lung Pathology Characteristics following Pulmonary Infection with *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain. *Am J Pathol.* 2013 Nov; 183(5): 1397–1404. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.07.008
36. Metzger D. W., Salmon S. L., and Kirimanjeswara G. Differing Effects of Interleukin-10 on Cutaneous and Pulmonary *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain Infection. *Infect Immun.* 2013 Jun; 81(6): 2022–2027. doi: 10.1128/IAI.00024-13
37. Tärnvik A., Berglund L. Tularemia. *European Respiratory Journal* 2003 21: 361-373; DOI: 10.1183/09031936.03.00088903
38. Carvalho C. L., Lopes de Carvalho I., Zé-Zé L., Nuncio M. S.,b and Duartea E. L. Tularaemia: A challenging zoonosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2014 Mar; 37(2): 85–96. doi: 10.1016/j.cimid.2014.01.002
39. Mani R. J., Morton R.J., Clinkenbeard K. D. Ecology of Tularemia in Central US Endemic Region. *Curr Trop Med Rep.* 2016; 3: 75–79. doi: 10.1007/s40475-016-0075-1
40. Kittl S., Francey T., Brodard I., Origgi F. C., Borel S., Ryser-Degiorgis M. P., First European report of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* isolation from a domestic cat. *Veterinary Research* volume 51, Article number: 109 (2020)
41. American Veterinary Medical Association. Tularemia facts. Dostupno na : <https://www.avma.org/tularemia-facts> (pristupljeno: 10. travanj. 2022)
42. Ellis J. , CF Oyston P., Green M. , Titball R. W. Tularemia. *ASM Journals, Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 15, No. 4, Tularemia (October, 2002) DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.631-646.2002>
43. Boisset S., Caspar Y., Sutera V., and Maurin M. New therapeutic approaches for treatment of tularaemia: a review. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 40. doi: 10.3389/fcimb.2014.00040
44. European Centre for Disease Prevention and Control. Tularemia. Dostupno na: <https://www.ecdc.europa.eu/en/tularaemia/facts> (pristupljeno: 10. travnja. 2022.)
45. Government of Canada. Pathogen Safety Data Sheets: Infectious Substances – *Francisella tularensis*. Dostupno na: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/francisella-tularensis-material-safety-data-sheets-msds.html> (pristupljeno : 10. travanj. 2022.)

46. Karataş Yeni D., Büyük F., Ashraf A., and Salah ud Din Shah M. Tularemia: a re-emerging tick-borne infectious disease. *Folia Microbiol (Praha)*. 2021; 66(1): 1–14. doi: 10.1007/s12223-020-00827-z
47. Barry E. M., Cole L. E., and Santiago A. E. Vaccines against tularemia. *Hum Vaccin*. 2009 Dec; 5(12): 832–838. doi: 10.4161/hv.10297
48. Jia Q. and Horwitz M. A. Live Attenuated Tularemia Vaccines for Protection Against Respiratory Challenge With Virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 8: 154. doi: 10.3389/fcimb.2018.00154
49. Griffin K. F., Oyston P. C. F., Titball R. W. *Francisella tularensis* vaccines. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, Volume 49, Issue 3, April 2007, Pages 315–323, <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00219.x>
50. National Human Genome Research Institute. Messenger RNA (mRNA). Dostupno na: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/messenger-rna>
51. Biontech Pfizer. Mehanizam djelovanja mRNA. Dostupno na: <https://impfung.biontech.de/hr/impfung/mechanism-of-mrna.html>
52. ThermoFisher Scientific. PCR Basic. Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>
53. ThermoFisher Scientific. Basic Principles of RT-qPCR. Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>
54. Gallique M., Bouteiller M. and Merieau A. The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication?. *Front. Microbiol.*, 28 July 2017 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01454>
55. Brodmann M., Dreier R. F. , Broz P., Baslerb M. *Francisella* requires dynamic type VI secretion system and ClpB to deliver effectors for phagosomal escape. *Nat Commun*. 2017; 8: 15853. doi: 10.1038/ncomms15853
56. Bröms J. E., Lavander M., Meyer L., and Sjöstedt A. IglG and IglII of the *Francisella* Pathogenicity Island Are Important Virulence Determinants of *Francisella tularensis* LVS. *Infect Immun*. 2011 Sep; 79(9): 3683–3696. doi: 10.1128/IAI.01344-10
57. Santic M., Molmeret M., Abu Kwaik Y. Modulation of biogenesis of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida*-containing phagosome in quiescent human macrophages and

- its maturation into a phagolysosome upon activation by IFN- γ . Cellular microbiology (08 June 2005) | <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00529.x>
58. Straskova A. and Stulik J. Intracellular pathogenesis of *Francisella tularensis*. Mil. Med. Sci. Lett. (Voj. Zdrav. Listy) 2012, vol. 81(1), p. 27-39. DOI: 10.31482/mmsl.2012.004
59. Woolard M. D., Hensley L. L., Kawula T. H., Frelinger J. A. Respiratory *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain Infection Induces Th17 Cells and Prostaglandin E2, Which Inhibits Generation of Gamma Interferon-Positive T Cells. ASM Journals | Infection and Immunity | Vol. 76, No. 6. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.01412-07>
60. Cole L. E., Elkins K.L., Michalek S. M., Qureshi N., Eaton L. J., Rallabhandi P., et. al. Immunologic Consequences of Francisella tularensis Live Vaccine Strain Infection: Role of the Innate Immune Response in Infection and Immunity. J Immunol 2006; 176:6888-6899; doi: 10.4049/jimmunol.176.11.6888

8. KRATKI ŽIVOTOPIS PRISTUPNIKA

OSOBNJE INFORMACIJE:

IME I PREZIME: Vedrana Nefat
SPOL: Ž
DATUM I MJESTO ROĐENJA: 07.10.1997., Rijeka
DRŽAVLJANSTVO: Hrvatsko
MAIL: vedrananefat7@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2004. – 2012.: Osnovna škola „Milan Brozović“ Kastav
2012. – 2016.: Medicinska škola u Rijeci – smjer: Sanitarni tehničar
2017. – 2020.: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci -Preddiplomski sveučilišni studij
Sanitarnog inženjerstva
2020. – 2022.: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci – Diplomski sveučilišni studij
Sanitarnog inženjerstva