

**BABEŞ-BOLYAI TUDOMÁNYEGYETEM, KOLOZSVÁR**

Biológia és Geológia Kar

Orvosi Biológia Szak

# **MAGISZTERI DOLGOZAT**

## **Egy új, bursai dendritikus sejtekre specifikus ellenanyag tesztelése IBDV fertőzött bursa Fabricii-n**

**Szerző: Harmati Petra-Anikó**

Témavezető: **Dr. Nagy Nándor**, habilitált egyetemi docens, Semmelweis  
Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai, Szövet- és  
Fejlődéstani Intézet

Konzulens: **Dr. Kósa Ferenc**, egyetemi adjunktus, Babeş-Bolyai  
Tudományegyetem, Magyar Biológiai és Ökológiai Intézet

**Kolozsvár, 2016**

# TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	1
BEVEZETÉS .....	2
IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	3
1. A bursa Fabricii immunológiai jelentősége és főbb morfológiai jellemzői.....	3
2. A bursa follikulusok velőállományának sejttípusai és jelölésük .....	5
3. A fertőző bursitis jellemzése.....	8
CÉLKITŰZÉSEK .....	12
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	13
1. Kísérleti állatok.....	13
2. Minták szövettani feldolgozása.....	13
2.1. A fagyasztott zselatinos blokk elkészítése.....	13
2.2. A fagyasztott májas blokk elkészítése .....	14
3. Fagyasztott blokkok metszése.....	14
4. A metszetek hisztológiai, immuncitokémiai és immunfluoreszcens vizsgálata .....	14
4.1. Hematoxin-eozin festés .....	14
4.2. Immuncitokémia.....	14
4.3. Kettős immunfluoreszcens festés .....	15
4.4. Felhasznált ellenanyagok.....	16
5. A metszetek kiértékelése.....	16
EREDMÉNYEK .....	17
1. Az IBDV fertőzés okozta bursitis immuncitokémiai jellemzése .....	17
2. A dendritikus sejtek és az IBD vírus lokalizációjának vizsgálata konfokális mikroszkópiával .....	25
KÖVETKEZTETÉSEK.....	27
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	29
KIVONAT .....	30
ABSTRACT.....	31
BIBLIOGRÁFIA .....	32

## BEVEZETÉS

Az utóbbi 50 évben a gazdasági és tudományos fejlődés magával vonta a baromfitenyésztés modernizálását is. A szigorúbb biztonsági szabályok és oltási programok bevezetése a legtöbb baromfit érintő betegséget visszaszorította vagy eltüntette. Mindezek ellenére a fertőző bursitis, (gumboro betegség) napjaink legsúlyosabb fiatal csirkéket érintő, magas mortalitású és súlyos immunszuppressziót okozó betegsége. Ez főként a fertőzést okozó egyes vírustörzsek nagyfokú ellenállásával magyarázható: a vírus csirkék hiányában is képes túlélni a fertőtlenítést és a következő állományok fertőződésének veszélye fennmarad (Parkhurst 1964).

A csirkehús és a tojás a világ összes táján fogyasztott élelemforrás, évente 50 milliárd csirkét nevelnek fogyasztási célra. Ha figyelembe vesszük, hogy a tenyészállományok vakcinációjára és takarmányozására mekkora összegek fordítódnak, belátható, hogy egy esetleges fertőzés rendkívüli gazdasági károkat okoz a baromfitenyésztésben, amellett hogy fokozott egészségügyi kockázatot is jelent (Gardin *et al.* 2008). Továbbá, az immunszuppresszió miatt, a fertőzésen átesett madarak fogékonyak lesznek másodlagos megbetegedésekre is, amely magával vonja a további antibiotikumos, vegyi anyagok és vitaminos kezelések szükségességét. Mindez közvetetten az emberek egészségére is fokozott kockázatot jelent, a húsban megmaradó és a környezetbe kerülő kémiai anyagok felhalmozódása által (Ingrao *et al.* 2013).

A fertőző bursitis patomechanizmusának vizsgálata és megértése közelebb vezethet minket a betegség leküzdéséhez. Azok az ellenanyagok, amelyek specifikusan jelölik az immunrendszer sejtjeit vagy a patogént, jól alkalmazhatóak immunológiai kutatásokban a sejtes interakciók megfigyelésére, hozzájárulva a fertőzés módjának és gátlásának megtalálásához. A laboratóriumi kutatásokban, egy megfelelően jellemzett ellenanyag széles körben használható diagnosztikai célú analízisek során. A sejtvonal specifikus ellenanyagokkal lehetővé válik, különböző immunsejtek nyomon követése, szöveti eloszlásuk feltérképezése, szerveken belüli differenciálódásuk tanulmányozása. Továbbá, a specifikus sejtfelszíni markerek segítségével lehetőség nyílik a sejtek izolálására is.

Ösztöndíjas hallgatóként az elmúlt években többször is lehetőségem volt a Semmelweis Egyetem Fejlődésbiológiai Laboratóriumában dolgozni. Kísérletes munkám célja, egy új, dendritikus sejteket felismerő egér monoklonális ellenanyag jellemzése volt, egészséges illetve fertőző bursitisen átesett madarak nyirokszervein.

# IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 1. A bursa Fabricii immunológiai jelentősége és főbb morfológiai jellemzői

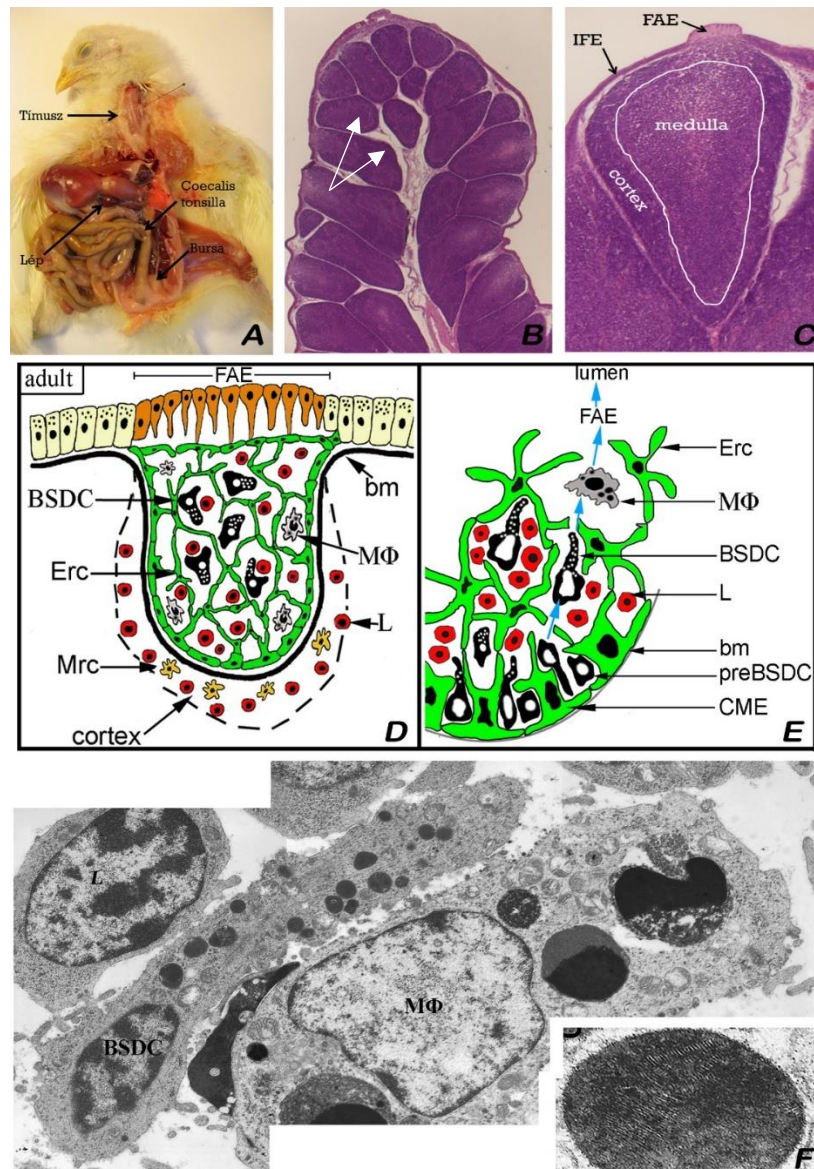
A bursa Fabricii a madarakra jellemző primer nyirokszerv, amely elengedhetetlen szerepet játszik az immunválasz kialakításában és az antigén specifikus ellenanyagok termelésében. Ebben a szervben zajlik a B-limfociták limfoid előalakokból történő differenciálódása és érése, valamint az immunglobulin gének átrendeződése, amelynek eredményeképpen kialakul a madár immunrepertoárja. Az érett B-limfociták a bursa Fabricii-ből keringés útján a másodlagos nyirokszervek (coecalis tonsilla, lép) B-sejt dependens területeire jutnak, ahol képesek felismerni a testidegen antigéneket, patogéneket és a megváltozott saját struktúrákat is (Ratcliffe 2006).

A bursa Fabricii elhelyezkedését tekintve, a kloáka dorzális részén található (1A. ábra). Kifejlett csirkében 1,7 cm átmérőjű ovális üreges szerv, lumene kapcsolatban áll a vastagbél üregével. Bár embrionális eredete sokáig bizonytalan volt, a legújabb kutatások arra utalnak, hogy a bursa az ektodermából alakul ki (Nagy & Oláh 2010). A bursa Fabricii izmos tokban helyezkedik el, a lument hosszanti irányba 15–20 redő tagolja, amelyet számos follikulum tölt ki

(1B. ábra). A follikulumok hosszúkásak, ovális alakúak és a bursa alapegységét képezik. Szöveti szerkezetükben elkülöníthetünk egy központi, sejtsegegyebb velőállományt (medulla) és az ezt körülvevő keskeny kéregállományt (cortex). A follikulumok felszínét interfollikuláris hám (IFE) borítja, kivételt a csúcsi rész jelent, ahol follikulum-asszociált hám (FAE) található (1C. ábra). A FAE teremti meg a kapcsolatot a bursa lumene és a follikulumok medulláris állománya között. A többi hámsejtől eltérően a FAE alatt nincs bazális membrán, helyette úgynevezett FAE-támasztó hámsejtek sorai találhatóak. A kéreg- és velőállományt bazális membrán választja el egymástól (1D. ábra). A velőállomány szélén levő hámsejtek ellaposodnak, árkdokat alkotva, kortiko-medulláris hámot (CME – cortico-medullary epithelium) hoznak létre (Nagy 2001) (1E. ábra).

A velőállomány stromális sejtálózatát retikuláris hámsejtek és szekréción dendritikus sejtek alkotják, amelyek megteremtik a B-limfociták éréséhez szükséges mikrokörnyezetet. A kéregállomány alapvázát a medullától eltérően retikuláris kötőszövet alkotja, amely extracelluláris mátrixot is termel (Oláh, Nagy & Vervelde 2014).

A felnőtt madarakban a bursa Fabricii visszafejlődik. A bursában 3 hónapos kor után jelentkeznek az involúcióval járó változások, ezek azonban nagyon eltérőek lehetnek a fajok között. A bursa involúciója White Leghorn csirkék esetén a 20. hét körül kezdődik és a 28. hétre be is fejeződik. Ez alatt a kéreg és a velóállomány sejtes állományának és extracelluláris vázának folyamatos leépülése figyelhető meg. Ezt követően a bursában nem zajlanak B-sejt érésével kapcsolatos folyamatok (Ciriaco *et al.* 2003).



**1. ábra: A bursa Fabricii elhelyezkedése és szöveti szerkezete.** (A) Kiboncolt 2 hetes csirke primer (tímusz, bursa Fabricii) és szekunder nyirokszerveinek (coecalis tonsilla, lép) anatómiai elhelyezkedése. (B) Kinagyított bursai redő, egymás mellett elhelyezkedő folliculusokkal (nyilak). (C) Bursa folliculus: a felszint folliculus–asszociált hám (FAE), illetve interfolliculáris hám (IFE) borítja, két fő része, a kéregállomány (cortex) és a velóállomány (medulla). (D) A bursai folliculus sémás ábrázolása: A velóállományt hámrétikulum (Erc), szekréciós dendritikus sejtek (BSCD), makrofágok (MΦ) és B-limfociták (L) alkotják. A kéregállományt bazális membrán (bm) választja el a velóállománytól. (E) A kéreg-velő határ (CME) és velóállomány szerkezetének ábrázolása: a bursai DC előalakok (preBSCD) megfigyelhetők a CME sejtek között. Differenciálódásuk során a medulla centrális részére vándorolnak. Terminális differenciálódásuk során a medulla MΦ-it hozzák létre. (F) A BSDC elektronmikroszkópos fotója: kerékküllő mintázatú sejtmag, megnyúlt sejtalkak, szeldelt sejtfelszín és jól kivehető membrán menti szekréciós granulumok. Jobb alsó sarokban egy kinagyított granulum figyelhető meg, amely lamelláris szerkezetet mutat. A BSDC mellett B-sejt (L) és egy makrofág (MΦ) látható belsejében fagocitált sejtörmelékkal (D-F: Nagy *et al.* 2016).

## 2. A bursa folliculusok velőállományának sejttípusai és jelölésük

A bursa folliculus kéreg- és velőállományra tagolódik. A velőállományt négy fő sejttípus alkotja: limfociták, makrofágok, retikuláris hámsejtek és szekréciós dendritikus sejtek (BSDC).

Az itt található limfociták többsége Bu-1 antigént (chB6) kifejező **B-limfocita**. Elektronmikroszkópos képek alapján a kerek morfológiájú B-limfociták heterochromatikus (sötétre festődő) sejtmaggal rendelkeznek (1F. ábra). A Bu-1 jelölés kirajzolja a B-limfocitákkal tömött bursai folliculusokat (2A. ábra). A 74.2 monoklonális ellenanyagra specifikus **makrofágoknak** euchromatikus sejtmagja van és citoplazmájukban fagocitált sejttörmelék található (1F. ábra). A medulla makrofágjai eltérnek a máshol találhatóktól és az eddigi kutatások arra utalnak, hogy ezek valójában előregedett BSDC-eknek felelnek meg (Oláh & Glick 1992). A cytokeratin intermedier filamentumot termelő **retikuláris hámsejtek** csillag alakúak, felszínük sima, sejtmagjuk szintén euchromatikus. Ezek a sejtek háromdimenziós hálózatot alkotnak és alapvázat biztosítanak a medullát kitöltő B-limfocitáknak (2B. ábra).

A **bursai szekréciós dendritikus sejteket (BSDC)** Oláh Imre és Bruce Glick írta le először 1978-ban (Oláh & Glick 1978). Ezek a sejtek szintén nyúlványosak, sejtmagjuk pedig a limfociták sejtmagjának kerékküllő mintázatra emlékeztető heterochromatikus szerkezetet mutat. A bursai dendritikus sejtek plazmamembránja alatt lamelláris szerkezetű granulumok figyelhetők meg, amelyek molekuláris összetétele még nem ismert (1F. ábra). Feltételezik, hogy granulumok tartalma szekréció útján a B-sejtek környezetébe ürül, és ezáltal irányítja differenciálódásukat. Mindezek mellett, mint antigén prezentáló sejtek, fontos szerepet játszanak a B-limfociták kikelés utáni érésében (Oláh & Glick 1978, 1987).

A csirke immunrendszere sokban különbözik az emlősökétől. Az antigén prezentáló sejtek (APC) feladata, hogy stimulálják a naiv T-sejteket, ezáltal proliferációra készítetve azokat. Az APC-k teremtik meg a kapcsolatot az adaptív és természetes immunitás között. A fagocitózisra képes sejtek a csirkében, melyek némileg különböznek az emlősök sejtjeitől, a következőek: makrofágok, dendritikus sejtek, heterofilek (emlős neutrofilek megfelelői), illetve trombociták, melyek közül az utóbbi kettő, feltehetően szerepet játszhat az antigén prezentálásban is. Trombociták és granulociták csak minimális számban fordulnak elő a bursa Fabricii állományában (Wu & Kaiser 2011).

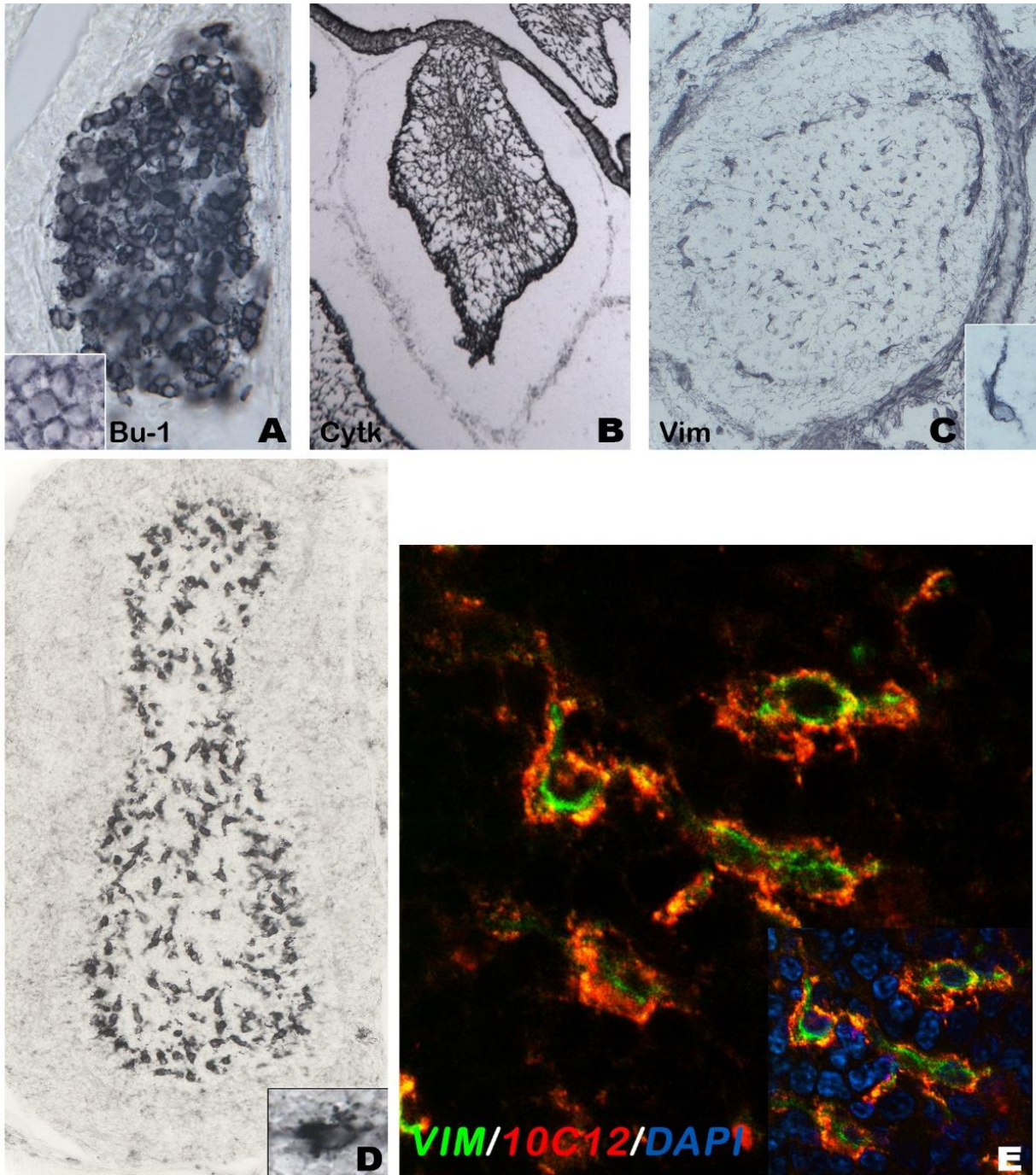
A csirkében az APC-k közül a makrofágokat vizsgálták a legtöbbször viszont a dendritikus sejtek patológiás folyamatokban betöltött szerepéről nagyon keveset tudunk. Ennek

az a magyarázata, hogy bár a madarak dendritikus sejtjeinek azonosítására számos marker használható: vimentin intermedier filamentumot jelölő ellenanyag, 74.3 nevű ellenanyag vagy a dendritikus sejtek felszínén megkötött IgG immuncitokémiai kimutatása; ezekkel a markerekkel nem lehet patológiás folyamatokban végigkövetni a BSDC-et. Továbbá, nincs olyan BSDC specifikus marker, amivel a bursai dendritikus sejteket izolálni, immunológiai és fejlődésbiológiai kísérletekben azonosítani lehetne.

A *vimentin* intermedier filamentumot (IF) felismerő (3B4) klón volt az első publikált BSDC-re jellemző molekuláris marker (Oláh, Kendall & Glick 1992) (2C. ábra). A vimentin IF dendritikus sejteken kívül előfordul a kötőszöveti sejtekben is, ezért nem tekinthető dendritikus sejtekre specifikus ellenanyagnak. Ugyancsak csirke dendritikus sejtekre jellemző markerként írták le a *CVIChNL-74.3* ellenanyagot, ami citoplazmatikus granulumokat jelöl (Jeurissen, Claassen & Janse 1992). Korábban kettős festéssel kimutatták, hogy a 74.3, illetve az anti-vimentin ellenanyag ugyanazon a sejteken kolokalizál (Oláh & Nagy 2013). Ugyanakkor a 74.3 ellenanyag hátránya, hogy gyakran festi a limfociták körüli teret is (háttér ad), ezért nem megfelelő a dendritikus sejtek pontos elkülönítésére. A *felszíni IgG*-t (IgY) felismerő ellenanyag is alkalmazható a csirke dendritikus sejtek jelölésére. A BSDC nem termel IgG-t, azonban megköti ezt felszínén. Hátránya azonban az, hogy dendritikus sejtek azonosítására csak a kikelés után alkalmazható, valamint a laza IgG kötődés miatt *in vitro* immunológiai és embriológiai vizsgálatokra nem alkalmas (Oláh & Nagy 2013).

Szakdolgozati munkám során azt tapasztaltam, hogy a *10C12 ellenanyag* szelektíven jelöli a BSDC-eket a bursa velőállományában, hasonló eloszlási mintázattal, mint az eddig használatos dendritikus sejtmarkerek (2D. ábra). A 10C12 nem jelöli a kortiko-medulláris hámban (árkád régió) található BSDC előalakokat. A kettős immunfluoreszcens festésű metszeteket konfokális pásztázó mikroszkóppal vizsgálva igazoltuk, hogy amíg a vimentin intermedier filamentum a citoplazmában helyezkedik el, a sejtmagot körbevéve, addig a 10C12 antigén a dendritikus sejtek sejtmembránja körül koncentrálnak (2E. ábra) (Harmati 2014).





**2. ábra: A normál bursa Fabricii immuncitokémiai jellemzése. (A)** Bu-1 festés a B-limfocitákat jelöli. **(B)** A cytokeratin festés kirajzolja a medulla hámretikulum alapvázát. **(C)** A vimentin intermedier filamentumot jelölő marker festi a dendritikus sejteket, de az interfollikuláris kötőszöveti sejtekben is előfordul. **(D)** A 10C12 marker, nyúlványos morfológiájú, szekréciós dendritikus sejteket jelöli a bursa velőállományában. **(E)** Konfokális mikroszkópia: vimentin (zöld), 10C12 (vörös) kettős immunfluoreszcens festésű metszeteken. A 10C12 a sejtmembrán közelében, míg a vimentin a citoplazmában a sejtmag körül lokalizálódik. A sejtmagok DAPI-val (kék) vannak megjelölve. (A-E: (Harmati 2014))

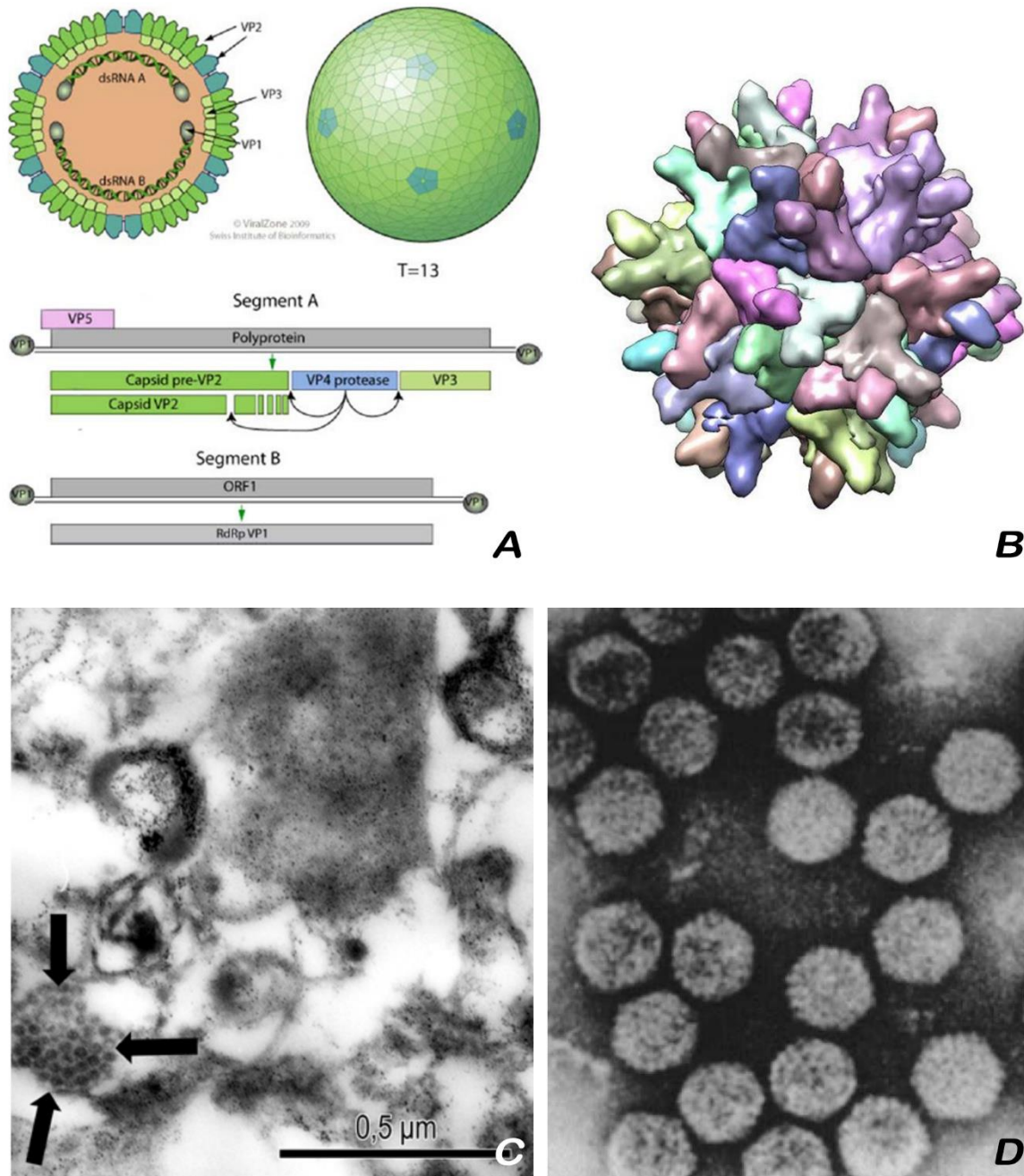


### 3. A fertőző bursitis jellemzése

A fertőző bursitis a fiatal csirkék egyik legsúlyosabb immunszuppresszióval járó fertőző betegsége, amely jelentős károkat okoz a baromfitenyésztésben. A fertőzést először 1957-ben a Delaware állambeli Gumboro városában észlelték, innen származik a másik neve, a gumboro betegség. A fertőzést leíró Cosgrove, ezt először madár nefrózishoz nevezte el, a veséket is érintő feltűnő bevérvések miatt. A csirkéken számos antibiotikus és vitaminos kezelés is hatástalannak bizonyult. Mivel bakteriális fertőzésnek nem volt nyoma, vírust gyanítottak a betegség okozójának (Cosgrove 1962).

A következő években sikerült igazolni, hogy a fertőző bursitis okozója, valóban egy vírus (Helmboldt & Garner, 1964), mégpedig a *Birnaviridae* családba, *Avibirnavirus* génezshoz tartozó, kettős láncú RNS vírus, az IBDV (infectious bursal disease virus) (Müller, Islam & Raue 2003). Az IBDV egy lipidburok nélküli kis vírus. A virion formának egyetlen, ikozaéder alakú kapszidja van, amely 32 kapszomérből tevődik össze (3B. ábra) (van den Berg 2000). Az RNS genom két részre tagolódik (3A. ábra). A nagyobb, A szegmens, két nyílt leolvasási keretet (ORF) tartalmaz, amely egy poliproteint kódol. Ez két struktúrfehérjére (VP2 és VP3) és egy szerin-proteázra (VP4) hasítódik. A VP5 vírusfehérje szintén itt kódolt, ez a vírus regulációjában és terjesztésében játszik szerepet. A kisebb, B szegmens, a VP1, virális RNS polimerázt kódolja (Alkie & Rautenschlein, 2016).

A vírusnak két szerotípusát különíthetjük el, amelyek közül az 1. típusú okoz immunszuppressziót és klinikai tüneteket a csirkéknél. Az 1. szerotípuson belül számos patotípus is előfordul, gyengétől egész a nagyon virulensig (Skinner & Schat, 2014). Egészen 1987-ig a vírustörzsek alacsony virulenciát mutattak, a mortalitási ráta nem érte el a 2%-ot. Az IBDV nagyon virulens törzseit a 80-as évek végén írták le Európában és ezek gyorsan szétterjedtek a világon, súlyos gazdasági és egészségügyi kockázatot jelentve a baromfitenyésztésben (van den Berg 2000). Napjainkban a nagyon virulens IBDV fertőzés mortalitási rátája Európa szerte elérheti a 100%-ot SPF (Specific Pathogen-Free) csirkék, 50-60%-ot tojó-csirkék, míg 25-30%-ot brojlerek (húscsirkék) esetén (Ingrao *et al.* 2013). Továbbá a kísérletekben gyakran alkalmazott, White Leghorn csirkék sokkal fogékonyabbnak bizonyultak a nagyon virulens IBDV fertőzésre, valamint a tünetek is sokkal súlyosabbak voltak, mint a húshibrid fajtáknál (Sá *et al.* 2016).



**3. ábra: Az IBD vírus szerkezete és elektronmikroszkópos képe.** (A) Az IBD vírus sémás ábrázolása. A vírusgenom két szegmensből áll: az A szegmens struktúr és szabályzó fehérjét, míg a kisebb B szegmens virális RNS polimerázt kódol (Taghavian 2013). (B) Az IBDV külső felépítése, a kapszomerek különböző színnel jelölve; Protein Data Bank ID: 2GSY (Garriga *et al.* 2006). (C) Elektronmikroszkópos képen megfigyelhető a vírusrészek csoportosulása egy makrofág belsejében (Bíró *et al.* 2011). (D) A vírus kinagyított elektronmikroszkópos képe (van den Berg 2000).

A vírus célszerve a jól fejlett, 3-6 hetes csirke bursa Fabricii, ahol a B-limfocitákat pusztulását okozza, T-limfocitákat vonz és aktiválja a dendritikus sejteket. A fertőzés apoptotikus és nekrotikus folyamatokat indít be a folliculusok velőállományban. Az itt levő

makrofágokban kimutathatóak vírusrészecskék és fagocitált sejtörmelék is (3C-D. ábra). A limfoid sejtek számának csökkenése és a szöveti elváltozások a bursa Fabricii mellett, fokozatosan a többi limfoid szervben is megfigyelhetőek (Ingrao *et al.* 2013). Más fajok, mint például a pulyka (*Meleagris gallopavo*), pézsmaréce (*Cairina moschata*), fácán (*Phasianus colchicus*) vagy gyöngytyúk (*Numida meleagris*), tünetmentes hordozói és terjesztői is a vírusnak (van den Berg *et al.* 2000).

A fertőzés súlyos klinikai tünetekkel jár: az állatok bágyadtak, nincs étvágyuk, gyakori a vízszerű hasmenés, dehidratáció és a borzolt tollazat. A bursa Fabricii szöveti struktúrája jelentős elváltozásokat mutat: a fertőzést követő 2. naptól megduzzad, ödémássá válik, bevérzések figyelhetőek meg rajta, majd a 4. naptól kezdődően lassan veszít a tömegéből, atrófiássá válik (Cheville 1967).

A vírus pontos patomechanizmusáról nagyon keveset tudunk. A klinikai tünetek kialakulásának egyik feltételezett oka az, hogy az IBDV direkt úton aktiválja a dendritikus sejteket és makrofágokat, majd indirekt úton a T-sejteket. Mindez fokozott gyulladási citokin termelés és apoptotikus mediátorok felhalmozódása által, szeptikus sokkhoz hasonló állapotot idéz elő (van den Berg 2000). Korábbi kutatások azt bizonyították, hogy a csirke B-limfoblasztoid sejtek kezelése proteázokkal vagy N-glikozilációt gátló szerekkel, az IBDV fertőzőképesség csökkenéséhez vezetett, amely arra utalt, hogy az N-glikozilált membrán polipeptidek szerepet játszanak a vírusfertőzés kezdeti szakaszában (Ogawa *et al.* 1998). Későbbi kutatások, arra utalnak, hogy az IBDV az  $\alpha 4\beta 1$  integrin receptoron keresztül kapcsolódhat a célsejtekhez (Delgui *et al.* 2009). Transzkripciós termékek vizsgálatával, azt is sikerült igazolni, hogy a Toll-like receptor szignalizációs út kulcsszerepet játszik a vírusfertőzés alatt. A vizsgálat során 48 olyan gént találtak, amely fokozottan átíródtak a fertőzés során, ezek a bursa gyulladáisos, kemotaktikus és T-sejt stimuláló folyamataiban játszanak szerepet. A bursai sejtek proliferációjáért és differenciálódásáért felelős gének közül pedig 12 szupresszáldott. A CCL5, CCL4 és IL-8 kemokinek transzkripciója szintén növekszik a fertőzés során, amely hozzájárul a dendritikus sejtek aktiválásához és a nem-specifikus immunválasz kialakulásához (Guo *et al.* 2012). A mintázatfelismerő receptorok közé tartozó Toll-like receptorok (TLR) közül a TLR3 és TLR7 játszik szerepet a vírusok elleni védelemben. Az IBDV fertőzés során a kettős RNS láncot felismerő TLR3 száma jelentősen megnő, amely aktiválja az antivirális IFN- $\beta$  termelését (Karpala, Lowenthal & Bean 2008).

A fertőzést túlélő állományban tartós immunszupresszió lép fel. Rendszerint a bursa Fabricii leépülése csak átmeneti, a folliculusok regenerálódhatnak, amelyet a limfociták újonnan betelepülése követ, de az elsődleges ellenanyag válasz, nem áll vissza a fertőzés előtti

szintre (Skinner & Schat, 2014). Mind a sejtes és a humorális immunválasz zavart szenved, így a madarak fogékonyabbak lesznek az opportunistá patogének okozta fertőzésekre, valamint nem megfelelően reagálnak a vakcinációra. Emiatt a termelők gyakran folyamodnak antibiotikum terápiához, a fertőzések megfékezésének céljából. Ez egyaránt csökkent gazdasági termeléssel és az emberi egészséget is érintő következményekkel jár (Ingrao *et al.* 2013). A nagyon virulens IBDV törzsek ellen számos vakcina létezik. Használják például, *in ovo* DNS vakcinákat kombináltan előlt-vakcinával (Park *et al.* 2009), valamint szolubilis BAFF (B-sejt aktiváló faktor) kezelést a B-limfociták működésének fokozására és az immunglobulin szekréció növelésére (Chen *et al.* 2009). Viszont a legtöbb vakcina, a vírus gyors mutációs rátája miatt, nem mindig hatásos: a fertőzés lezajlik enyhébb tünetekkel, de ezt követően immunszupresszió alakul ki.

Az IBDV fertőzés egyik legsúlyosabb következménye a bursa specifikus mikrokozonyzetének pusztulása és a B-limfociták számának csökkenése. Korábbi publikációk számtalanszor felvetették annak lehetőségét, hogy a vírus elsődleges célpontjai a BSDC-k és a B-limfociták csak ezután fertőződnek meg (Oláh *et al.* 1997, 2001; Kabell *et al.* 2006). Az IBDV patogenitásában betöltött szerepük ellenére, a BSDC immunmorfológiai sajátosságai nem ismertek és jelenleg nincs olyan BSDC specifikus marker, amely alkalmas lenne a BSDC-k jellemzésére és nyomon követésére az IBDV fertőzés során.

## CÉLKITŰZÉSEK

A Semmelweis Egyetem Fejlődésbiológia Laboratóriumában végzett korábbi kísérletünkben sikerült igazolni, hogy a müncheni Ludwig-Maximilians Egyetem Élettani Intézetében előállított 10C12 nevű ellenanyag szelektíven jelöli a bursa Fabricii szekréción dendritikus sejtjeit.

Laboratóriumunk együttműködve Dr. Palya Vilmos kutatócsoportjával (Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt.) a madarakat érintő vírusfertőzések patomechanizmusát vizsgálta. A fertőző bursitis (gumboro betegség vagy IBDV fertőzés) egy nagyon súlyos immunszuppresszív fertőzés, amely a fiatal 3-6 hetes madarak nyirokszerveit, főként a bursa Fabricii-t érinti. A vírus a bursai B-limfociták pusztulását okozza, de feltételezésünk szerint a bursa szekréción dendritikus sejtjei elsődleges célpontjai a vírusnak.

Jelenlegi kutatásom során, a 10C12 antigén expresszióját követtük nyomon a bursa Fabricii-t érintő IBDV fertőzés során.

Célkitűzéseim a következők voltak:

- Az IBDV fertőzött és egészséges bursa Fabricii összehasonlítása immuncitokémiai módszerek segítségével;
- A 10C12 és anti-vimentin ellenanyagok összehasonlítása IBDV fertőzött bursa Fabricii-n;
- A 10C12 marker és egy anti-IBDV marker kolokalizációjának vizsgálata.

# ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

## 1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez az IBDV fertőzött mintákat a Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt. biztosította. A csirkéket 3 hetes korban fertőzték meg, egy nagyon virulens IBDV törzssel, szemcsepp útján. A madarak a fertőzést követően 2, 4, 7, 14 és 21 nappal kerültek levágásra. Minden vizsgálati mintavételnél 2-3 állatot használtunk. Kontrollnak 3-6 hetes White Leghorn SPF (specific pathogen free) csirkéket alkalmaztunk.

## 2. Minták szövettani feldolgozása

Az IBDV fertőzött csirkékből származó szerveket (bursa Fabricii, coecalis tonsilla, lép) májba vagy fixálás után zselatinba ágyasztuk be, majd fagyasztott blokkokat készítettünk. A kriotómmal készült metszeteken immuncitokémiai, illetve immunfluoreszcens festéseket végeztünk.

### 2.1. A fagyasztott zselatinos blokk elkészítése

A feldolgozni kívánt szerveket 1 órán keresztül 4%-os paraformaldehidben (PFA) fixáljuk, majd ezt követően háromszor mossuk 5 percet hagyva a mosások közt. A mosást foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS; pH: 7,2) végezzük. 1 liter PBS összetétele: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; desztillált víz. A mosás után a szervekre 15%-os szacharóz oldat kerül és ez egy éjszakát áll  $4^\circ\text{C}$ -os hűtőben. A beágyazáshoz 7,5%-os zselatint használunk. A szerveket a beágyazás előtt zselatinba helyezük és  $37^\circ\text{C}$ -on 1 órát tároljuk. Ezt követően műanyag tálkákat félig megtöltünk zselatinnal figyelve arra is, hogy ne legyen buborék, mivel ez a fagyasztáskor töréshez vezethet. Amikor a zselatin megkötött a szerveket ráhelyezzük és sztereomikroszkóp alatt megfelelően orientáljuk. Ezután 5 percet várunk, hogy a szervek hozzátapadjanak a zselatin alaphoz, majd annyi meleg zselatint öntünk a tálkába, hogy az ellepje a szerveket. A tálkákat  $4^\circ\text{C}$ -os hűtőbe helyezük, amíg a zselatin teljesen megköt. A tálkákból kivágjuk a megfelelő méretű zselatin blokkot, majd ezt Shandon Cryomatrix segítségével előre feliratozott kartonpapírra ragasztjuk, és filctoll segítségével bejelöljük a metszés irányát. Az így elkészült blokkot folyékony nitrogénben  $-60^\circ\text{C}$ -ra lehűtött izopentánban (Sigma-Aldrich, M32631) fagyasztjuk pár percig. A fagyasztott blokkok akár azonnal is metszhetőek vagy felhasználásig  $-80^\circ\text{C}$ -on tárolhatók.



## 2.2. *A fagyasztott májas blokk elkészítése*

A májas blokk készítésekor a vizsgálni kívánt szerveket májjal vesszük körbe, ezzel védve őket a direkt fagyástól. Egy kartonpapírra májszeletet helyezünk, majd rátesszük a vizsgálni kívánt szerveket és ezeket körberakjuk és befedjük májdarabokkal odafigyelve arra, hogy minél kevesebb levegővel töltött rész maradjon. A szerveket úgy orientáljuk, hogy a metszési síkba minden szerv beleessen. Az így elkészült májas blokkot folyékony nitrogénben fagyasztjuk és  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároljuk felhasználásig.

## 3. **Fagyasztott blokkok metszése**

Az elkészült zselatinos blokkokat  $-24^{\circ}\text{C}$ -on, míg a májas blokkokat  $-19^{\circ}\text{C}$ -on metszettük Shandon gyártmányú kriotómmal. Először a blokkokat leválasztjuk a kartonpapírról, Shandon Cryomatrix segítségével felragasztjuk a kriotóm blokktartójára, majd a kriosztátba helyezve addig várunk, amíg a ragasztó polimerizálódik. A fagyasztott mintákból 8-12  $\mu\text{m}$  vastagságú metszeteket készítünk, amelyeket poly-L-lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezekre veszünk fel. A májas blokkok esetén a fixálás utólagosan történik, ekkor a metszeteket tartalmazó tárgylemezeket 10 percig acetonban fixáljuk, amit 10 perc szárítás követ. A fagyasztott metszeteket hűtőben tároljuk a felhasználásig.

## 4. **A metszetek hisztológiai, immuncitokémiai és immunfluoreszcens vizsgálata**

### 4.1. *Hematoxilin-eozin festés*

A hematoxilin-eozin festés során először 5 percig rehidratáljuk a metszeteket PBS-ben, majd desztillált vízzel való leöblítés következik. A metszeteket tartalmazó küvettába 6 percig hematoxilin festék kerül, amely a sejtmagokat színezi kékre. Ezután folyó csapvíz melletti mosás, majd 30 másodperces eozin oldattal való festés következik, amely rózsaszínre színezi a citoplazmát. A festés után a dehidratáció következik, az alábbi módon: kétszer abszolút alkoholban, utána izopropil alkoholban és végül xilolban mossuk a metszeteket. Utolsó lépésként DePex-el történik a lefedés.

### 4.2. *Immuncitokémia*

A metszeteket tartalmazó lemezeket 10 percig PBS oldatot tartalmazó küvettában rehidratáljuk. A zselatinos metszeteket rehidratáció után PBS-ben hagyva 15 másodpercig mikrohullámú sütőbe helyezve melegítjük, ezzel biztosítva a zselatin kioldódását. A

rehidratáció után következik a primer ellenanyagok rámerése a tárgylemezekre. A használt ellenanyagok listáját az 1. táblázat tartalmazza. Ez előtt azonban a tárgylemezeket gondosan le kell törölni papírvattával, figyelve a metszetek épségének megőrzésére. Erre azért van szükség, hogy a különböző ellenanyagok ne folyhassanak össze. A primer ellenanyagokból kb. 70 µl kerül egy metszetre és 45 percig áll rajtuk, eközben a lemezek vizes kamrában lefedve tárolódnak szobahőmérsékleten, elkerülve a kiszáradást. Ezután óvatosan leöntjük az ellenanyagot, majd 3x5 perces PBS-es mosás következik. A lemezek törlése után rákerül a hígított (a hígítást 1%-os PBS-BSA oldattal végezzük; az oldatot úgy készítjük, hogy feloldunk 1 g BSA-t (Bovine Serum Albumin; Sigma, A9647), 100 ml PBS-ben, majd szűrés után 0,1%-ban  $\text{NaN}_3$ -ot adunk hozzá) biotinilált szekunder ellenanyag, amely szintén 45 percet áll, hasonlóan az előző körülményekhez. Eközben elkészítjük avidin-biotin-peroxidáz komplexet (ABC), amely fél órát áll 4°C-os hűtőben. Ebben az esetben a hígításhoz sima PBS-t használunk. A 45 perc lejárta után leöntjük a szekunder ellenanyagot, 3x5 percig mossuk, majd peroxidos blokkolást végzünk. Ennek célja a szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolása. A blokkolás során PBS-t tartalmazó küvetta 30%-os  $\text{H}_2\text{O}_2$  oldatot adagolunk, majd behelyezzük a tárgylemezeket és 10 percig állni hagyjuk őket. A 3x5 perces mosást követően a metszetekre rákerül az ABC-oldat és 30 percet így inkubálódnak. Ezalatt kloronaftol törzsoldatot hígítunk ki PBS-ben (50 ml PBS + 50 µl kloronaftol) majd ezt fél órán át sötétben kevertetjük mágneses keverővel. Az oldatot szűrőpapíron átszűrjük és sötétben tároljuk felhasználásig. Az ABC-vel történő inkubálás befejeztével ismét mosás következik (3x5 perc PBS-el) majd a lemezek az előzőleg elkészített kloronaftolos oldatban hívódnak elő. Ezzel mutatjuk ki a kötődött peroxidáz enzim aktivitását, amelyet sötétkék színű csapadékot képez az immunreakció helyén. A kloronaftolt tartalmazó küvetta 3%-os  $\text{H}_2\text{O}_2$  oldatot adagolunk, majd behelyezzük a lemezeket és 30 percig sötétben tároljuk ezeket. Legvégül ismét PBS mosás, majd vízdékony lefedőanyaggal történő lefedés következik. Az így elkészült lemezeket 4°C-on tároljuk.

#### 4.3. *Kettős immunfluoreszcens festés*

A 10C12 ellenanyag más ellenanyaggal való kolokalizációjának vizsgálatára kettős immunfluoreszcens festést alkalmaztunk. A kettősfestés során először rámerjük az első primer ellenanyagot a metszetekre, amelyet a már ismertetett módon inkubálunk 45 percig. Mosást (3x5 perc PBS) követően fluorokrómmal kapcsolt szekunder ellenanyagot (Invitrogen, Life Technologies) pipettázunk a metszetekre majd ezeket sötétben tárolva ismét 45 percet várunk. Ezután ismét egy primer ellenanyag rámerése következik, amelyet 45 perc fénytől védett

inkubáció és mosás követ, majd az előzőtől eltérő fluoreszcenciájú és izotípusú fluorokrómokkal kapcsolt szekunder ellenanyag rámerése következik. Az inkubáció 30. percében a sejtmagok festésére használt DAPI-t (4,6 diamidino-2-phenylindole) is rámerjük a metszetekre, majd 15 perc elteltével mosás és lefedés következik.

#### 4.4. Felhasznált ellenanyagok

**1. táblázat: A felhasznált primer és szekunder ellenanyagok**

<b>Primer ellenanyagok</b>	<b>Izotípus</b>	<b>Hígítás (PBS-BSA)</b>
anti-vimentin (klón: 3B4)	IgG2A	1:200
anti-cytokeratin (klón: Lu5)	IgG1	1:200
anti-IBDV (klón: 13.2)	Nyúlban termelt poliklonális	1:1000
anti-csirke Bu-1, B-sejt marker (klón: BoA1)	IgG1	1:2
anti-csirke dendritikus sejtmaker (klón: 10C12)	IgG1	1:100
<b>Szekunder ellenanyagok</b>		
biotinilált anti-egér IgG	IgG	1:200
biotinilált anti-nyúl IgG	IgG	1:200
fluorokrómokkal kapcsolt ALEXA-488-konjugált anti-egér IgG2A	IgG2A	1:100
fluorokrómokkal kapcsolt ALEXA-488-konjugált anti-nyúl IgG	IgG	1:100
fluorokrómokkal kapcsolt ALEXA-594-konjugált anti-egér IgG	IgG	1:100

## 5. A metszetek kiértékelése

A metszeteket fény-, lumineszcencia-, illetve konfokális pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk és az ezekhez kapcsolt kamera segítségével digitális felvételeket készítettünk. Ezek a felvételek szerepelnek 1-9. ábrákon. A digitális képek feldolgozását Adobe Photoshop CC 2014 és Fiji ImageJ programmal végeztem.

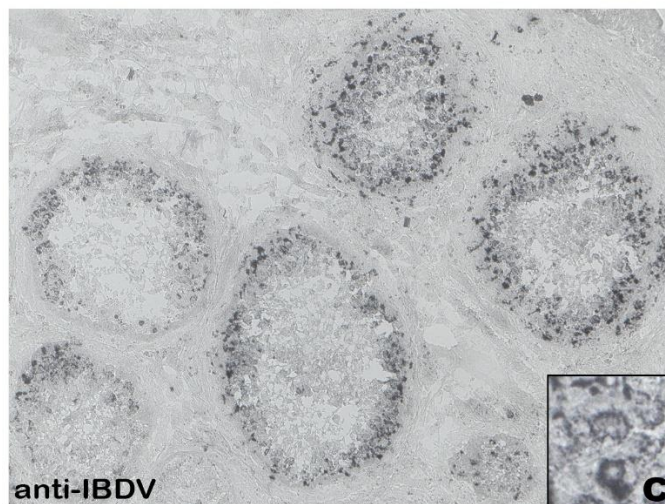
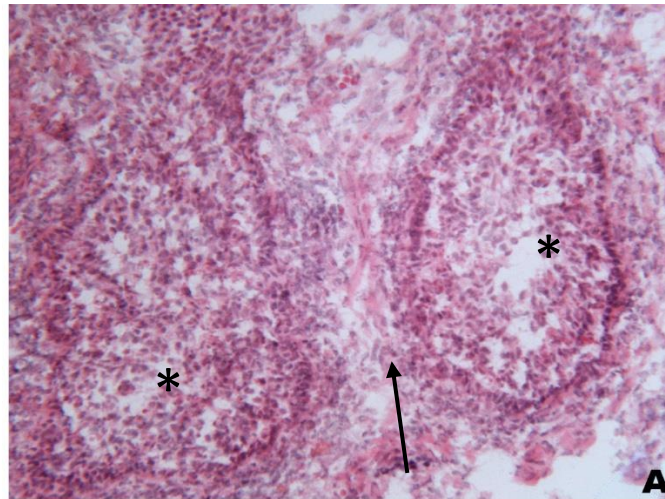
# EREDMÉNYEK

## 1. Az IBDV fertőzés okozta bursitis immuncitokémiai jellemzése

Az IBDV fertőzés után 2. naptól a 21. napig követtem nyomon a bursában végbemenő hisztológiai változásokat. A 10C12 és anti-vimentin ellenanyag segítségével a dendritikus sejteket, az anti-IBDV ellenanyaggal a vírust, az anti-cytokeratin markerrel a hámretikulumot, míg a Bu-1 ellenanyaggal a B-sejteket tanulmányoztuk. Valamennyi stádiumra jellemző volt a bursa folliculusainak heterogén immuncitokémiai festődése, amely először az eltérő fertőzési állapotra, később a folliculusok egymástól különböző regenerációs ütemére vezethető vissza. A kontroll madarak vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a markerek festési mintázata megegyezik a bevezetésben bemutatottakkal (2. ábra).

**Két nappal az IBDV fertőzés után** jelentős hisztológiai változások figyelhetőek meg a bursában. A bursai redők folliculusainak elrendezése és mérete megváltozik, hematoxin-eozin (H&E) festéssel jól kivehető (4A. ábra), hogy a folliculusok közötti állomány megvastagszik, a kéregállomány elvékonyodik, míg a velőállomány ödémássá válik, a sejtek hólyagosak. A folliculusok mérete és alakja rendkívül változatosságot mutat.

A 10C12 ellenanyag immuncitokémiai festési mintázata alapján, elszórtan vannak olyan folliculusok, amelyekben még nem történt jelentős szerkezeti módosulás (4B. ábra: bal oldali folliculus), míg a folliculusok többségben a medulla leépülése és a dendritikus sejtek kéreg-velő határ közelében történő felhalmozódása figyelhető meg. A 10C12 ellenanyag gyakran intenzív citoplazmatikus immunreakciót mutatott (4B. ábra - nagyított kép). Az anti-IBDV festési mintázatának sokfélesége (4C. ábra) jól tükrözi a folliculusok eltérő fertőzöttségét. Két fő folliculus típust különíthetünk el: az egyik esetben a vírus a folliculusok kéregállományában található, a másik típusban az anti-IBDV pozitívitás a velőállományban is megjelenik. A legtöbb esetben az anti-IBDV ellenanyag sejtekre lokalizált immunreakciót mutatott.



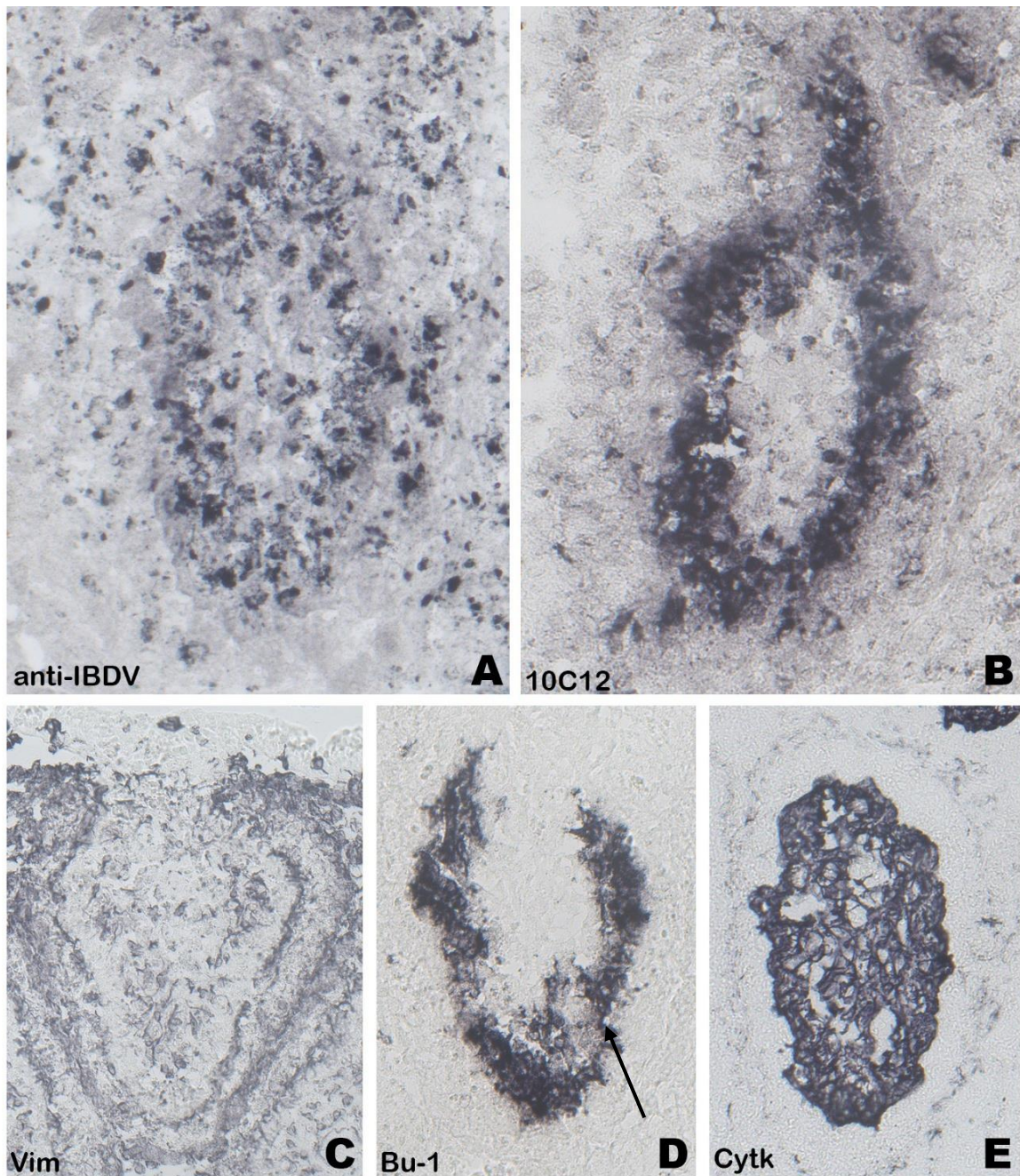
**4. ábra: A bursa folliculusok jellemzése 2 nappal az IBDV fertőzés után. (A)** Hematoxilin-eozin festéssel jól kivehetőek a fertőzés hatására történt hisztológiai változások: a megvastagodott interfollikulás tér (nyíl) és a velőállomány leépülése („\*”-al jelölve). **(B)** A 10C12<sup>+</sup> dendritikus sejtek a kéreg-velő határ közelében csoportosulnak. A kinagyított sejteken látható, hogy a 10C12 citoplazmatikus expressziója megváltozik **(C)** Az anti-IBDV ellenanyag az IBD vírust tartalmazó sejteket jelöli. Nagyszámú IBDV<sup>+</sup> sejt figyelhető meg a velőállomány kéreg-velő határához közeli területein. A kinagyított IBDV fertőzött sejtek alakja nyúlványos.

A **fertőzés után 4 nappal** nagyszámú IBDV<sup>+</sup> sejt mutatható ki a kéreg- és velőállományban, valamint az IBDV<sup>+</sup> sejtek megjelennek elszórtan a folliculusok közötti térben is (5A. ábra). A 10C12<sup>+</sup> dendritikus sejtek festődése elmosódott képet ad, nagy sejtömegek figyelhetők meg a kéreg-velő határon, gyűrűszerűen koncentrálódva a centrálisan kiürült velőállományban (5B. ábra). A vimentin intermedier filamentum expressziója megnövekedik a fertőzés hatására; a vimentin immun pozitív sejtek megfigyelhetők a folliculuson belül (a vimentin<sup>+</sup> BSDC-k elszórtan vannak jelen a medullában) és kívül is, ahol kéregállomány homogén vimentin expressziót mutat (5C. ábra).

A Bu-1 festési mintázata jól mutatja az IBD vírus B-limfocitákra kifejtett súlyos hatását. A velőállomány B-limfocitáinak többsége elpusztult, helyettük apoptotikus sejtek és sejtörmelékek figyelhetők meg. A megmaradt B-sejtek a kéreg-velő határ közelében találhatóak, míg a medulla közepén nincs Bu-1<sup>+</sup> sejt. Érdekes megfigyelés, hogy a kéreg Bu-1 pozitivitása eltűnik (5D. ábra). A velőállomány alapvázat képező hámretikulum anti-cytokeratin ellenanyaggal történő festése nem mutat változást az egészséges szövethez képest (5E. ábra).

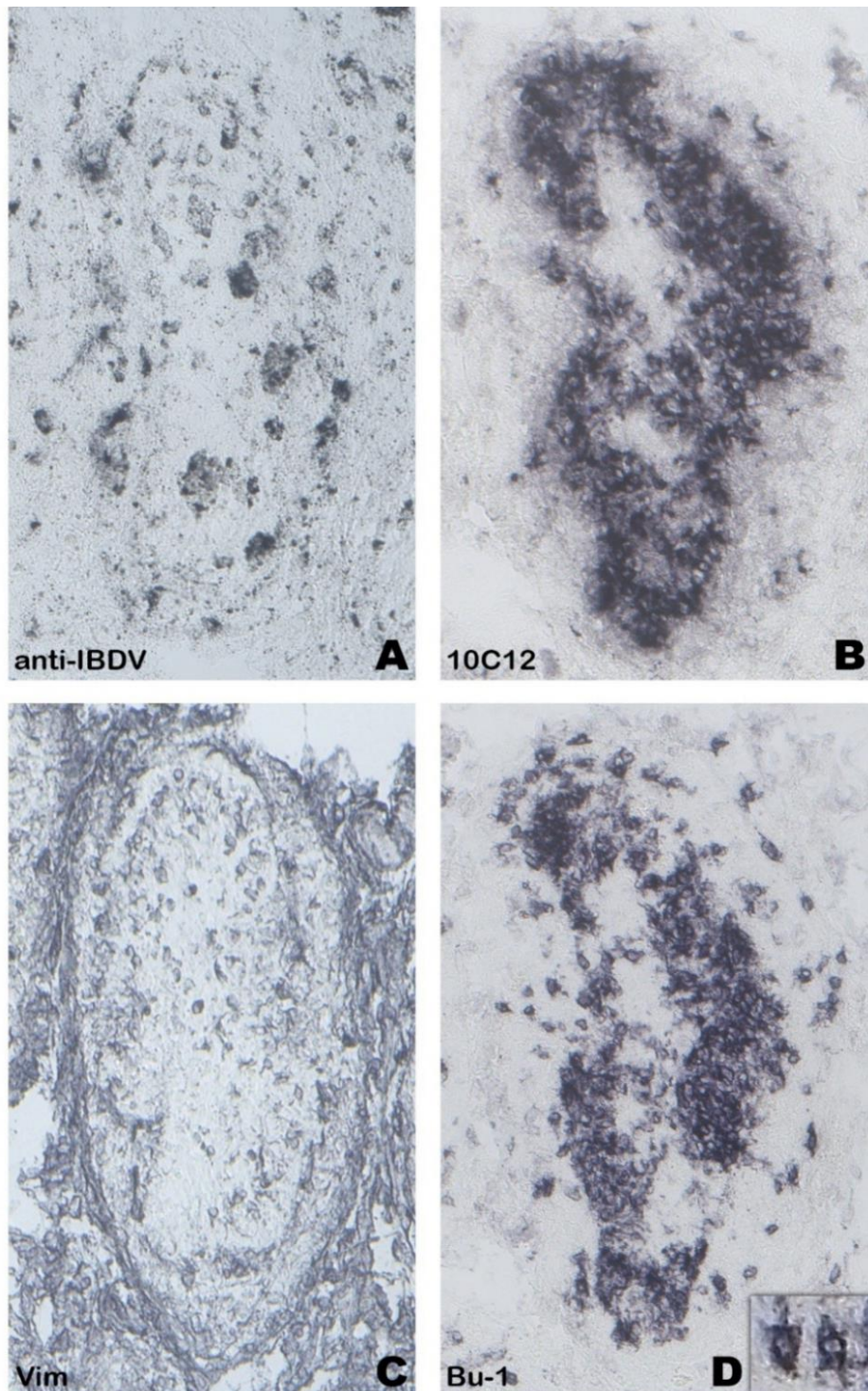
Az IBDV **fertőzés után 7 nappal** a bursa lassú regenerációja figyelhető meg. Az anti-IBDV festődés alapján csökken a vírus mennyisége. A folliculusok körüli kötőszövetben és azon belül a medullában, izolált sejtcsoportokban mutatható ki anti-IBDV pozitívitas (6A. ábra). A 10C12 ellenanyag festési mintázatából jól kitűnik, hogy a kéreg-velő határon levő sejtréteg felől megindul a medulla újra betelepülése dendritikus sejtekkel (6B. ábra). A néhány nyúlványos vimentin<sup>+</sup> sejt elkülöníthető a velőállományban. A kéregállomány homogén vimentin festődést mutat (6C. ábra). A Bu-1 ellenanyag jelölése hasonlít a 10C12 marker mintázatára. A medullában gyakran nyúlványos, csillag alakú Bu-1<sup>+</sup> sejteket láthatunk. Néhány Bu-1<sup>+</sup> sejt a kéregállományban is megjelenik (6D. ábra). Ez alapján elmondható, hogy a Bu-1<sup>+</sup> sejtek visszatelepülése a velőállományba hasonló módon történik, mint a 10C12<sup>+</sup> dendritikus sejteké.





**5. ábra: A bursa folliculusok jellemzése 4 nappal a fertőzés után.** (A) Az anti-IBDV jelölés a kéregállomány és kéreg-velő határon kívül az interfollikuláris térben is megfigyelhető. (B) A 10C12 jelölés elmosódott, nagy sejtcsoportosulások figyelhetők meg a kéreg-velő határon. A medulla középső része nem mutat festődést. (C) A vimentin expressziója megnövekedik: a vimentin<sup>+</sup> sejtek megfigyelhetők a folliculuson belül a medullában és kívül is, ahol kéregállomány homogén vimentin expressziót mutat. (D) A Bu-1-el jelölt B-limfociták szintén eltűnnek a medullából és a kéreg-velő határon csoportosult sejtek festődése elkent, sok apoptotikus sejtörmelékkel (nyíl). A cortexből nem mutathatók ki a Bu-1<sup>+</sup> B-limfociták. (E) A cytokeratin retikuláris hám marker festési mintázata az egészséges szövethez hasonló, helyenként nagyobb hézagokkal.



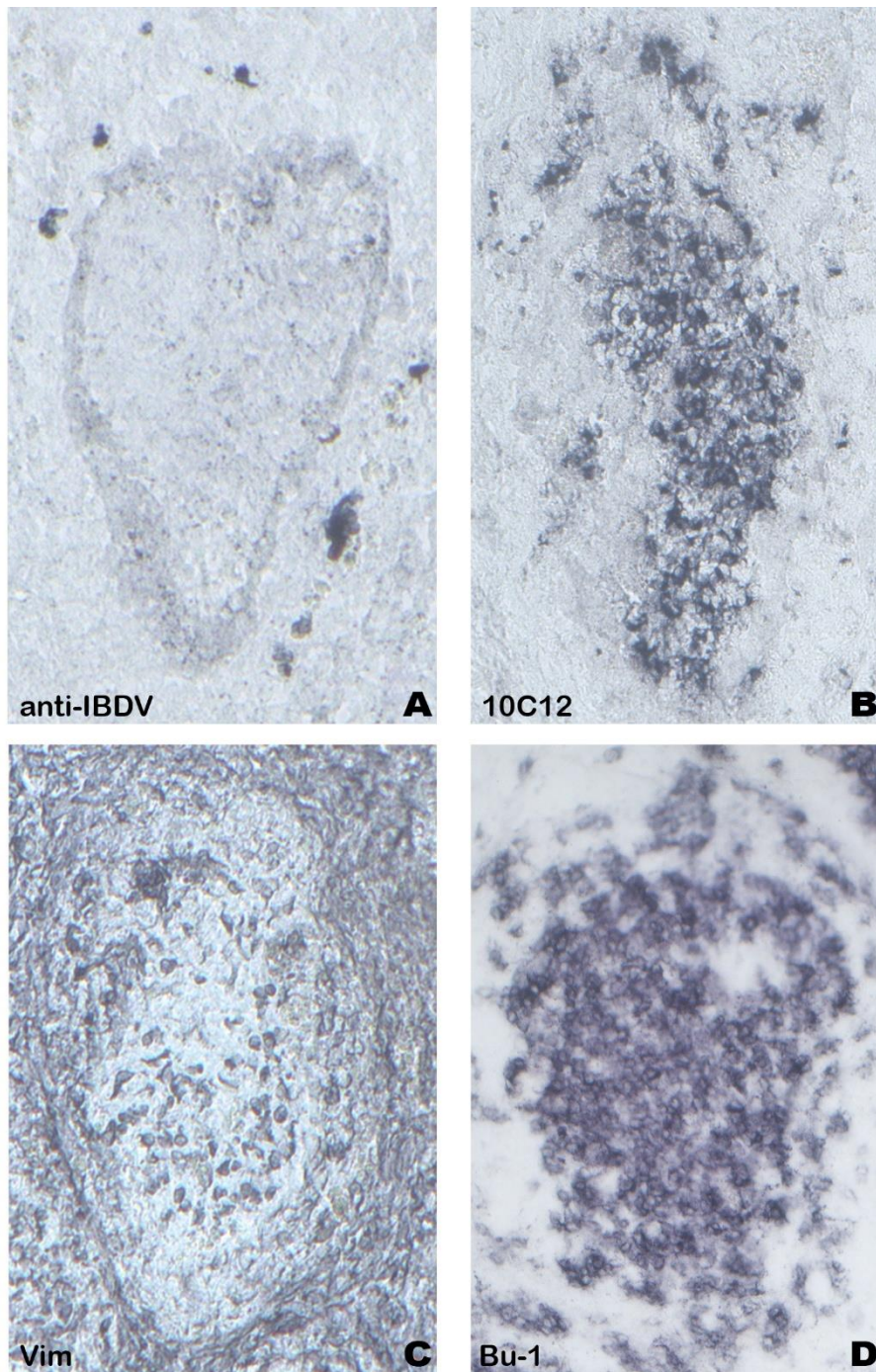


**6. ábra: A bursa folliculusok jellemzése 7 nappal a fertőzés után. (A)** Az anti-IBDV festődés előzőekhez viszonyítva lecsökken, a vírus elszórtan mind a kéreg és velóállományban megfigyelhető, nagyobb és kisebb sejtörmelékek formájában. **(B)** A 10C12 jelölés szintén elmosódott, de a kéreg-velő határtól elkezdődik a medulla középső részének újra betelepülése. **(C)** A anti-vimentin marker csak elszórtan fest a velóállományban. **(D)** A Bu-1-el jelölt B-limfociták visszatelepülése megkezdődik a velóállományba, a sejtek viszont nem kerekdedek, hanem csillag alakúak. Néhány kerek morfológiájú Bu-1<sup>+</sup> sejt megjelenik a cortexben.

**Két héttel a fertőzés után** már csak pár folliculusban találunk anti-IBDV<sup>+</sup> vírusrészeket (7A. ábra). A 10C12 marker mintázata alapján a folliculusokban előrehaladottabb regeneráció észlelhető, a szöveti szerkezet már az egészségeshez hasonlít (7B. ábra). A vimentin festődés még mindig erősebb pozitivitást mutat a folliculusok körül, mint a velőben. Egyre több vimentin<sup>+</sup> BSDC azonosítható a medullában (7C. ábra). A B-limfociták eloszlása szintén az egészséges állapothoz hasonlít, ahol a Bu-1<sup>+</sup> B-sejtek kitöltik a velőállományt (7D. ábra).

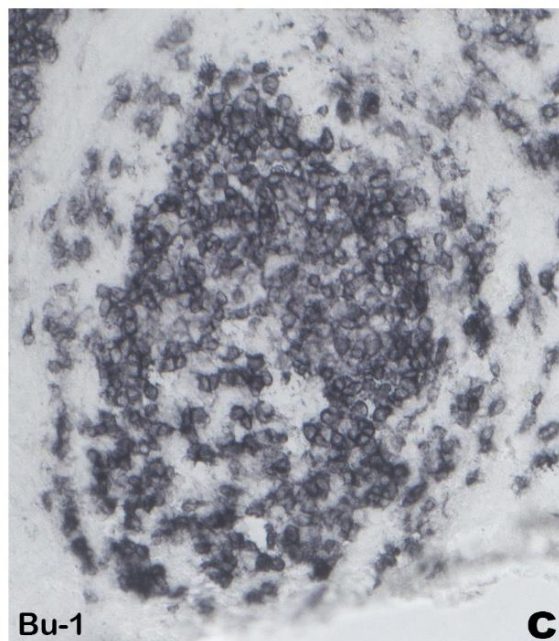
**Három héttel a fertőzés után,** folliculusok még mindig nagyon változatos képet mutatnak. A 10C12 ellenanyag festéséből jól látszik, hogy vannak folliculusok, amelyek regenerációja teljes, de vannak olyanok, amelyek elsorvadnak és nem regenerálódnak teljesen (8A. ábra). A folliculusok közül csak néhányban találunk, elszórtan anti-IBDV jelölést (8B. ábra). A B-sejtek fokozatosan benépesítik a regenerálódott folliculusok kéreg- és velőállományát (8C. ábra).





**7. ábra: A bursa folliculusok jellemzése 14 nappal a fertőzés után. (A)** Az anti-IBDV marker csak elszórtan jelöl a kéregben és a folliculusok közötti térben. **(B)** A 10C12 ellenanyag festési mintázata a normálhoz hasonló, a medulla újra megtelik dendritikus sejtekkel, viszont a kéregben is találhatóak nagyobb sejtcsoportosulások. **(C)** Az anti-vimentin homogén festési mintázata az interfollikuláris kötőszövetre és a folliculusok kéregállományára is kiterjed. **(D)** A Bu-1 jelölés jól mutatja a bursa regenerációját; a velőállomány feltelik kerek morfológiájú B-limfocitákkal.





**8. ábra: A bursa folliculusok jellemzése 21 nappal a fertőzés után. (A)** A 10C12 jelölése: a folliculusok regenerációja eltérő ütemben zajlik: bal oldalt egy teljesen regenerálódott, középen egy alig, míg a jobb szélén egy részlegesen regenerált folliculus látható. **(B)** Az anti-IBDV festődés csak pár folliculusban figyelhető meg. **(C)** A Bu-1 festés egy, a regenerációban előrehaladott folliculus B-limfocitáit mutatja.

## 2. A dendritikus sejtek és az IBD vírus kolokalizációjának vizsgálata konfokális mikroszkópiával

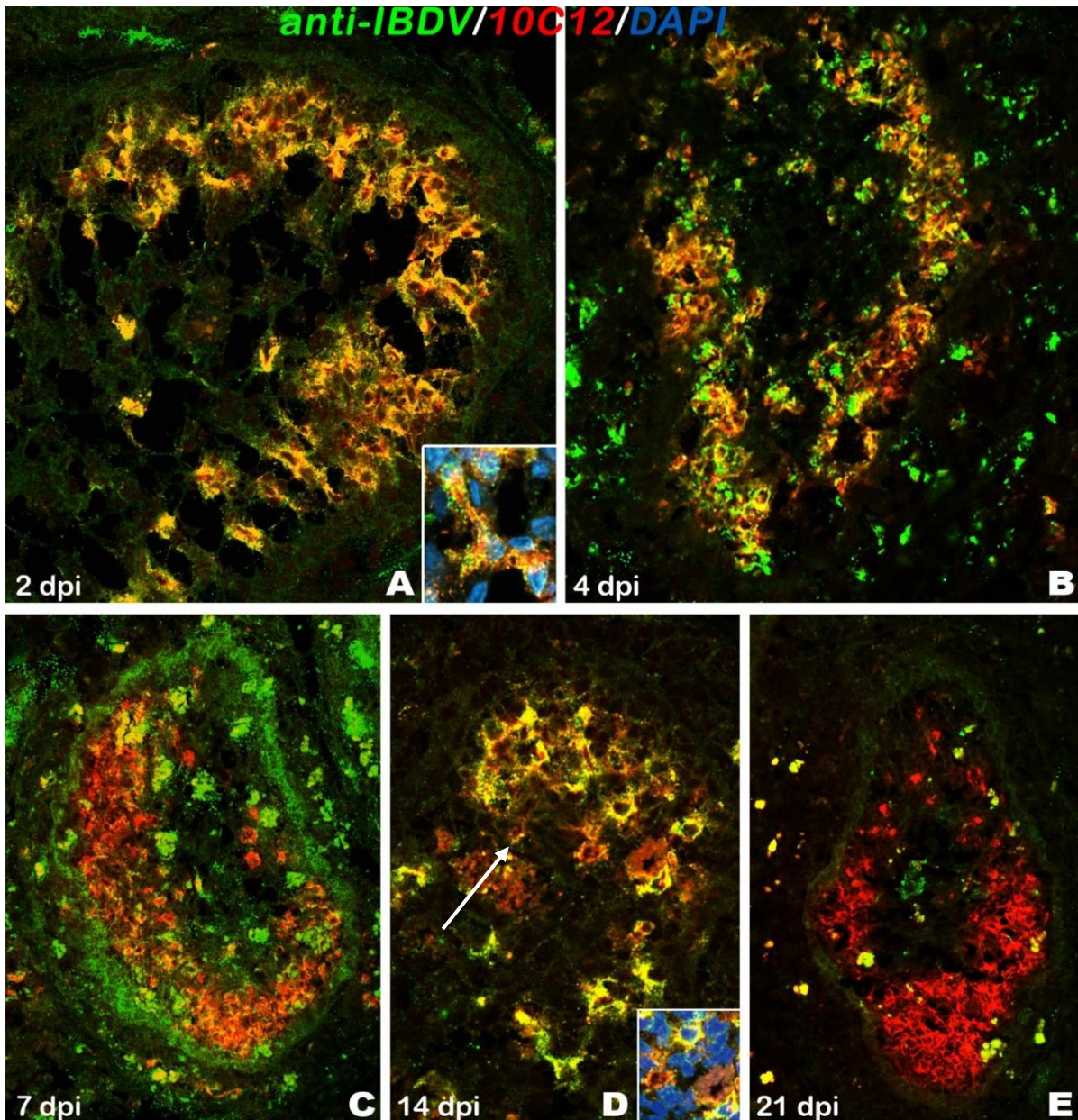
Mivel a párhuzamos metszeteken végzett immuncitokémiai festés alapján nehéz volt meghatározni, hogy a 10C12<sup>+</sup> dendritikus sejtek milyen kapcsolatban vannak az IBD vírussal, mivel az intenzív kloronaftolos immunreakció nem tette lehetővé a 10C12<sup>+</sup> BSDC-k elkülönítését, kettős immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk meg a fertőzés különböző stádiumban levő bursa Fabricii-t.

**A két nappal a fertőzés utáni** (2 dpi - days post infection) mintákban a 10C12 dendritikus sejt marker (vörös fluorokróm) és az anti-IBDV ellenanyag, nyúlban készült ellenanyag (zöld fluorokróm) kolokalizációt mutat (sárgás színárnyalat) a folliculusok velőállományában (9A. ábra). A sejtek kinagyított képén úgy tűnik, hogy a 10C12<sup>+</sup> dendritikus sejtek felszínéhez kötődik a vírus. **Négy nappal a fertőzés után** (4 dpi) jelentős a bursa leépülése, számos sejtörmelék figyelhető meg a bursa folliculusainak velőállományában. A 10C12 jelölése kolokalizál a vírussal, de jelentős anti-IBDV pozitivitás figyelhető meg a kéreg állományban és a folliculusok közötti állományban (9B. ábra).

**Hét nappal a fertőzés után** (7 dpi) megkezdődik a folliculusok regenerációja. A kettős festés alapján azok a folliculusok ahol több 10C12<sup>+</sup> dendritikus sejt van, kevesebb anti-IBDV pozitivitás észlelhető. Elkülönül a két marker festési mintázata, csak kevés sejtben mutatható ki kolokalizáció. A medullában anti-IBDV<sup>+</sup> jelölés nagyobb méretű sejtekre lokalizálódik. Ez annak köszönhető, hogy gyulladásszerű folyamatok által elpusztult vírus részeket és sejtörmeléket, feltételezhetően a makrofágok kebelezik be és szállítják el a folliculusokból (9C. ábra).

**Két héttel a fertőzés után** (14 dpi) a legtöbb folliculus valamilyen szinten regenerálódik. Kevés, nagyon csökevényes folliculusban találhatunk anti-IBDV és 10C12 kolokalizációt (9D. ábra). **Három héttel a fertőzés után** (21 dpi) még mindig találunk elszórtan vírus részeket, de többnyire a velőállományon kívül. A 10C12<sup>+</sup> sejtek száma fokozatosan gyarapodik, az immunreaktív sejtek elsősorban a kéreg-velő határon csoportosulnak (9E. ábra).





**9. ábra: A fertőzött bursa folliculusok immunfluoreszcens jellemzése konfokális mikroszkópiával.** Kettős immunfluoreszcens festés (anti-IBDV (zöld), 10C12 (vörös), DAPI (kék)). **(A)** Két nappal a fertőzés után (**2 dpi** – days post infection) az IBD vírus már kimutatható a folliculusok kéreg és velőállományában is. A kéreg-velő határon felsorakozó dendritikus sejtek (10C12) IBDV pozitívítását sárgás-narancs színárnyalat jelzi. Kinagyított felület: a 10C12<sup>+</sup>/IBDV<sup>+</sup> BSDC-k a folliculus velőállományában; a DAPI (kék) a sejtmagot jelöli. **(B)** Négy nappal fertőzés után (**4 dpi**) az IBDV<sup>+</sup> sejtek kimutatható elszórtan a folliculusok közötti állományban és a kéregben. A medullában is jelen van, nagy sejtsomókban, ahol kolokalizál a 10C12 markerrel. **(C)** Egy héttel a fertőzés után (**7 dpi**) a vírus mennyisége csökkeni látszik, de vannak folliculusok ahol erősen jelölődik a kéreg-velő határ. A vírus már nem kolokalizál a medulla összes dendritikus sejtjével. **(D)** Két héttel a fertőzés után (**14 dpi**) csak pár folliculusban figyelhető meg anti-IBDV pozitívítás. Ezekben a kisebb, még nem regenerálódott folliculusokban kolokalizál a 10C12 és anti-IBDV marker. A medullában sejttörmelék figyelhető meg (nyíllal jelölve). **(E)** Három héttel a fertőzés után (**21 dpi**) számos folliculus regenerálódott, csak elszórtan láthatunk anti-IBDV pozitívítást, a 10C12 ellenanyaggal jelölt dendritikus sejtek a kéreg-velő határ felől újratelepítik a velőállományt.

## KÖVETKEZTETÉSEK

A fertőző bursitis (gumboro betegség vagy infectious bursal disease, IBDV) a házityúk legnagyobb veszteségét okozó fertőző betegsége. Az IBD vírus a bursa Fabricii-t támadja meg, ahol gyors lefutású involúciót okoz, ami immunszuppresszióval és gyakran 30-80%-os elhullással jár. Az IBDV fertőzés következtében a nyirokszervek sejtes állományában szövettani változások következnek be, amellyel számos közlemény foglalkozik. Ugyanakkor, nincs adatunk arra vonatkozóan, hogy a bursa antigén prezentáló BSDC-k hogyan változnak vagy vesznek részt a fertőzésben és a regenerációban (Sharma *et al.* 2000; Mahgoub 2012; Ingraio *et al.* 2013).

A gumboro fertőzésen átesett csirkék bursájának immuncitokémiai vizsgálatával igazoltuk, hogy a 10C12 ellenanyag alkalmas eszköznek bizonyul az fertőzés során a bursai dendritikus sejtek nyomon követésére. A különböző fertőzés utáni stádiumokból származó mintákon, a 10C12 marker festési mintázata sokkal specifikusabb, mint a korábban használt anti-vimentin ellenanyag, amely az involúciókor fellépő kötőszöveti sejteket is jelöli.

A fertőzés után, 2 dpi és 4 dpi állapotban a bursa jelentős leépülését figyeltük meg. A Bu-1<sup>+</sup> sejtek többsége elpusztult, de a 10C12<sup>+</sup> sejtek megmaradtak a follikuluszokban. Az IBDV és 10C12 kettős immunfluoreszcens festéssel először igazoltuk, hogy az IBD vírus BSDC-ket fertőzi meg, konfokális mikroszkóppal vizsgálva kolokalizációt találtunk a vírus és dendritikus sejtek között. Így elmondható, hogy a dendritikus sejtek kapcsolatba lépnek a vírussal, a festési mintázat alapján a vírus a dendritikus sejtek felszínén is jelen van, ami arra utal, hogy a vírus képes megkötődni a dendritikus sejtek felszínén.

Mivel a 2 dpi stádiumban már nagy mennyiségben jelen van a vírus a bursa follikulusaiban, korábbi állapotú minták vizsgálatra van szükség a jövőben, ahhoz, hogy meg tudjuk állapítani a vírus pontos útját és bejutását a bursába. Mivel minden follikulusnak saját vérellátása van és véretek csak a cortexben találhatóak, kapilláris hálózatot létrehozva a kéregvelő határon (Oláh *et al.* 2014), feltételezhetjük, hogy a vírus a keringés útján juthat először follikulusok kéregállományába, majd onnan szétszóródva kerül a velőállományba és az interfollikuláris térbe. Így egy dendritikus sejtekkel ellentétes, cortexből medulla fele történő vándorlása figyelhető meg.

Továbbá, vizsgálatom során azt tapasztaltam, hogy az IBDV kimutatható a lépben és a coecalis tonsilla csíracentrumaiban is. Mindkét szekunder nyirokszervben kolokalizáció észlelhető, a 10C12<sup>+</sup> follikuláris dendritikus sejt és az IBDV között. Feltételezhető, hogy a

dendritikus sejteknek aktív szerepe lehet a vírus perifériás nyirokszervekbe való terjesztésében. Ennek igazolására további vizsgálatokra van szükség.

Jól ismert tény, hogy az IBDV hatására gyulladási folyamatok indulnak el, és nagy mennyiségű citokin és kemokin termelődik, amelynek jelentős szerepe lehet a velőállomány sejtjeinek pusztulásában (van den Berg 2000; Guo *et al.* 2012). Ennek következtében feltételezhetően a dendritikus sejtek és a B-limfociták a kéreg velő határ fele vándorolnak, ahol létrejön a vírus és immunsejtek közötti kapcsolat. Továbbá, a fertőzés során az egészséges állapothoz viszonyítva megnő a 10C12 antigén expressziója, ami miatt elmosódottabb festési mintázat látható. A következő kísérletünkben immunelektronmikroszkópiával szeretnénk meghatározni a 10C12 lokalizációját az IBDV fertőzött BSDC-ben.

Hét nappal a fertőzés után már megkezdődik a bursa regenerációja, amely lassú folyamat, eltart egészen a 21 dpi állapotig. A regeneráció folyamán kevés anti-IBDV<sup>+</sup> részecske végig kimutatható a folliculusokban. A regenerációban fontos szerepe lehet kortikomedulláris hám között található dendritikus sejt prekursoroknak (Nagy *et al.* 2016). Ezt a felvetést alátámasztja az a megfigyelésünk, hogy a 10C12 ellenanyag festési mintázata alapján a BSDC-k a kéreg-velő határon levő árkádokból befele vándorolva népesítik be újra a folliculus velőállományát.

Összehasonlítva az anti-vimentin és a 10C12 ellenanyagok festési mintázatát elmondható, hogy a 10C12 sokkal specifikusabb és alkalmas markernek bizonyul a BSDC-k nyomon követésére az IBDV fertőzés alatt. Így a jövőben egy ígéretes marker áll rendelkezésünkre, amely lehetővé teheti dendritikus sejtek izolálását IBDV fertőzött madaraktól, valamint közelebb vihet minket a fertőző bursitis patomechanizmusának megértéséhez és a dendritikus sejtek funkciójának tisztázásához.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Első sorban hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Nagy Nándornak, a budapesti Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Fejlődésbiológiai Laboratóriumának vezetőjének, aki rengeteg tanáccsal, rendkívüli odafigyeléssel támogatta munkámat. Köszönöm, hogy betekintést nyerhettem a laboratórium munkájába és elsajátíthattam számos technikát, amely a jövőben is hasznosnak fog bizonyulni számomra.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Oláh Imrének, a Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet egyetemi tanárának, aki munkámat sok értékes tanáccsal segítette.

Továbbá szeretném megköszönni a rengeteg segítséget a laboratórium munkatársainak, akik ottlétem alatt, bármikor segítő kezet nyújtottak, név szerint: Dr. Barad Csilla, Dr. Dóra Dávid, Fejszák Nóra, Fölker Orsolya, Dr. Herberth-Minkó Krisztina, Dr. Kocsis Katalinnak, Kovács Adrienn és Orbán Edit.

A Budapestre való utazásomhoz és az ottlétemhez szükséges anyagi támogatást szeretném megköszönni a következőknek: Apáthy István Alapítvány (Budapest), Balassi Intézet, Emberi Erőforrások Minisztériuma, Erasmus+ program és a Márton Áron Szakkollégium.

Végül pedig hálával tartozom Dr. Kósa Ferencnek, a kolozsvári Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Biológia szak, egyetemi adjunktusának és Dr. László Lajosnak az Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék egyetemi docensének a dolgozat elkészítéséhez adott tanácsokért.

# KIVONAT

## **Egy új, bursai dendritikus sejtekre specifikus ellenanyag tesztelése IBDV fertőzött bursa Fabricii-n**

A fertőző bursitis a fiatal csirkéket érintő súlyos immunszuppresszív betegség, amelyet az IBD (infectious bursal disease) vírus okoz. A fertőzés célpontja a madarak primer nyirokszerve, a bursa Fabricii, ahol a folliculusok velőállományának leépülése és a B-limfociták fokozott pusztulása figyelhető meg. Feltételezzük, hogy a BSDC az elsődleges célpontja, a magas elhullással és immunszuppresszióval jellemzett IBDV fertőzésnek.

Munkám során egy új, 10C12 elnevezésű, bursai dendritikus sejtekre (BSDC) specifikus ellenanyagot teszteltem egészséges illetve fertőző bursitisen átesett madarak bursáján. Az immuncitokémiai festések az mutatták, hogy a 10C12 marker specifikusan jelöli BSDC-k így egy alkalmas eszköz ezen sejtek nyomon követésére az IBDV fertőzés során, szemben a korábban használt vimentin markerrel, amely jelöli az kötőszöveti sejteket is. Konfokális mikroszkópiával sikerült igazolni, hogy a fertőzés során a kéreg-velő határ közelében felhalmozódó 10C12<sup>+</sup> dendritikus sejtek és IBD vírus kolokalizációt mutatnak.

Következtetés: a 10C12 ellenanyag alkalmas molekuláris marker az IBDV fertőzött BSDC-k szelektív jelölésére.

Kulcsszavak: fertőző bursitis, IBDV, bursa Fabricii, dendritikus sejt, BSDC

## **ABSTRACT**

### **Characterization of a novel bursal secretory dendritic cell specific monoclonal antibody on IBDV infected bursa of Fabricius**

Infectious bursal disease (IBD) is an immunosuppressive illness of young chickens caused by IBD virus. The infection targets the bursa of Fabricius, the primary lymphoid organ of the birds, where it causes the destruction of the medulla and the depletion of B-lymphocytes. Previous observations using IBDV specific antibodies strongly suggested that, at the very beginning of the infection the bursal secretory dendritic cells (BSDCs) in the bursal lymphoid follicle are the primary targets of IBDV, and B cells are secondarily infected. Despite the important immunological role of the BSDCs, their identification is still difficult, mostly due to the absence of lineage specific markers.

The aim of my study was to characterize the staining pattern of a novel BSDC specific mouse monoclonal antibody (mAb) clone 10C12, on the IBDV infected bursa of Fabricius. The immunocytochemistry staining showed that 10C12 mAb specifically stains BSDCs during IBDV infection. 10C12 is a more suitable marker for tracking BSDCs in IBDV infected bursa of Fabricius than previously used vimentin, which in addition to BSDC strongly stained the connective tissue. Double immunofluorescent staining analyzed with confocal microscopy supports the idea that in early stages of IBDV infection the 10C12<sup>+</sup> BSDCs are the primary target cells for the virus.

Conclusion: 10C12 mAb is a suitable molecular marker for detecting BSDCs both in healthy and IBDV infected bursa of Fabricius. Furthermore, introducing novel BSDC specific antibodies will greatly enhance our understanding of BSDC in host immune response to viral infections.

Keywords: infectious bursal disease, viral infection, bursa of Fabricius, bursal secretory dendritic cell



## BIBLIOGRÁFIA

- Alkie, T.N. & Rautenschlein, S. (2016) Infectious bursal disease virus in poultry : current status and future prospects. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, **7**, 9–18.
- van den Berg, T.P. (2000) Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A*, **29**, 175–194.
- van den Berg, T.P., Etteradossi, N., Toquin, D. & Meulemans, G. (2000) Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, **19**, 509–43.
- Bíró, E., Kocsis, K., Nagy, N., Molnár, D., Kabell, S., Palya, V. & Oláh, I. (2011) Origin of the chicken splenic reticular cells influences the effect of the infectious bursal disease virus on the extracellular matrix. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A*, **40**, 199–206.
- Chen, L., Ran, M.J., Shan, X.X., Cao, M., Cao, P., Yang, X.M. & Zhang, S.Q. (2009) BAFF enhances B-cell-mediated immune response and vaccine-protection against a very virulent IBDV in chickens. *Vaccine*, **27**, 1393–1399.
- Cheville, N.F. (1967) Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken. *The American journal of pathology*, **51**, 527–551.
- Ciriaco, E., Píñera, P.P., Díaz-Esnal, B. & Laurà, R. (2003) Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *Microscopy research and technique*, **62**, 482–7.
- Cosgrove, A.. (1962) An apparently new disease of chickens - avian nephrosis. *Avian Diseases*, **6**, 385–389.
- Delgui, L., Oña, A., Gutiérrez, S., Luque, D., Navarro, A., Castón, J.R. & Rodríguez, J.F. (2009) The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional  $\alpha 4\beta 1$  integrin ligand motif. *Virology*, **386**, 360–372.
- Gardin, Y., Palya, V., Paniago, M., Cazaban, C., Alva, B., Lozano, F. & Attrache, J. El. (2008) Gumboro, a worldwide problem. URL <http://www.transmune.com/Gumboro-Control/Gumboro-Disease-Special/Gumboro-a-worldwide-problem>
- Garriga, D., Querol-Audí, J., Abaitua, F., Saugar, I., Pous, J., Verdaguer, N., Castón, J.R. & Rodríguez, J.F. (2006) The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *Journal of virology*, **80**, 6895–905.
- Guo, X., Wang, L., Cui, D., Ruan, W., Liu, F. & Li, H. (2012) Differential expression of the Toll-like receptor pathway and related genes of chicken bursa after experimental infection with infectious bursa disease virus. *Archives of Virology*, **157**, 2189–2199.
- Harmati, P.-A. (2014) *A bursa Fabricii dendritikus sejtjeinek karakterizálása egy új monoklonális ellenanyaggal*. Államvizsga dolgozat. Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár.
- Helmboldt, C.F. & Garner, E. (1964) Experimentally induced Gumboro disease (IBA). *Avian diseases*, **8**, 561–75.

- Ingrao, F., Rauw, F., Lambrecht, B. & van den Berg, T. (2013) Infectious Bursal Disease: A complex host–pathogen interaction. *Developmental & Comparative Immunology*, **41**, 429–438.
- Jeurissen, S.H., Claassen, E. & Janse, E.M. (1992) Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen. *Immunology*, **77**, 75–80.
- Kabell, S., Igyártó, B.-Z., Magyar, A., Hajdú, Z., Biró, E., Bisgaard, M. & Oláh, I. (2006) Impact of heterophil granulocyte depletion caused by 5-fluorouracil on infectious bursal disease virus infection in specific pathogen free chickens. *Avian Pathology*, **35**, 341–348.
- Karpala, A.J., Lowenthal, J.W. & Bean, A.G. (2008) Activation of the TLR3 pathway regulates IFN $\beta$  production in chickens. *Developmental and comparative immunology*, **32**, 435–44.
- Mahgoub, H.A. (2012) An overview of infectious bursal disease. *Archives of Virology*, **157**, 2047–2057.
- Müller, H., Islam, M.R. & Raue, R. (2003) Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. *Veterinary Microbiology*, **97**, 153–165.
- Nagy, N. (2001) *A bursa Fabricii stromális elemeinek differenciálódása*. Doktori disszertáció. Semmelweis Egyetem, Budapest.
- Nagy, N., Bódi, I. & Oláh, I. (2016) Avian dendritic cells: Phenotype and ontogeny in lymphoid organs. *Developmental and Comparative Immunology*, **58**, 1–13.
- Nagy, N. & Oláh, I. (2010) Experimental evidence for the ectodermal origin of the epithelial anlage of the chicken bursa of Fabricius. *Development*, **137**, 3019–23.
- Ogawa, M., Yamaguchi, T., Setiyono, A., Ho, T., Matsuda, H., Furusawa, S., Fukushi, H. & Hirai, K. (1998) Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry. *Archives of Virology*, **143**, 2327–2341.
- Oláh, I. & Glick, B. (1978) Secretory cell in the medulla of the bursa of Fabricius. *Experientia*, **34**, 1642–1643.
- Oláh, I. & Glick, B. (1987) Bursal secretory cells: an electron microscope study. *The Anatomical record*, **219**, 268–74.
- Oláh, I. & Glick, B. (1992) Follicle-associated epithelium and medullary epithelial tissue of the bursa of Fabricius are two different compartments. *The Anatomical Record*, **233**, 577–587.
- Oláh, I., Horváth, E., Magyar, A., Nagy, E., Tóth, A., Minkó, K. & Gumati. (1997) Effect of Infectious Bursal Disease Virus on the Immunological Responsiveness of the Chicken. *Developmental and Comparative Immunology*, **21**, 96.
- Oláh, I., Kendall, C. & Glick, B. (1992) Differentiation of bursal secretory-dendritic cells studied with anti-vimentin monoclonal antibody. *The Anatomical record*, **233**, 111–20.
- Oláh, I., Magyar, A., Nagy, N., Horváth, E., Kovács, A. & Nagy, E. (2001) Effect of IBDV

Infection on the Secretory Dendritic Cells. *II. International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia* pp. 329–340.

- Oláh, I. & Nagy, N. (2013) Retrospection to discovery of bursal function and recognition of avian dendritic cells; Past and present. *Developmental and Comparative Immunology*, **41**, 310–315.
- Oláh, I., Nagy, N. & Vervelde, L. (2014) Chapter 2 – Structure of the Avian Lymphoid System. *Avian Immunology* pp. 11–44.
- Park, J.H., Sung, H.W., Yoon, B. II & Kwon, H.M. (2009) Protection of chicken against very virulent IBDV provided by in ovo priming with DNA vaccine and boosting with killed vaccine and the adjuvant effects of plasmid-encoded chicken interleukin-2 and interferon-gamma. *Journal of Veterinary Science*, **10**, 131–139.
- Parkhurst, R.T. (1964) On-the-Farm Studies of Gumboro Disease in Broilers. *Avian diseases*, **8**, 584–596.
- Ratcliffe, M.J.H. (2006) Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Developmental and comparative immunology*, **30**, 101–18.
- Sá, M., Rissi, D.R., Swayne, D.E., Sá, M., Rissi, A.D.R. & Ac, D.E.S. (2016) Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Produces More-Severe Disease and Lesions in Specific-Pathogen-Free ( SPF ) Leghorns Than in SPF Broiler Chickens Research Note — Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Produces More-Severe Disease and L. *Avian diseases*, **60**, 63–66.
- Sharma, J.M., KIM, I.-J.J., Rautenschlein, S. & Yeh, H.-Y.Y. (2000) Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental and Comparative Immunology*, **24**, 1–13.
- Skinner, M.A. & Schat, K.A. (2014) Chapter 16 - Avian Immunosuppressive Diseases and Immuno-evasion. *Avian Immunology* pp. 275–297. Elsevier.
- Taghavian, O. (2013) *Expression and Characterization of Infectious Bursal Disease Virus Protein for Poultry Vaccine Development and Application in Nanotechnology*.
- Wu, Z. & Kaiser, P. (2011) Antigen presenting cells in a non-mammalian model system, the chicken. *Immunobiology*, **216**, 1177–83.