Karakterizacija poliklonskih antitijela IgY iz kokošjih jaja za protein CA 15-3 te njihova specifičnost za homologni protein u serumu kuja

Jakšić, Leo

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:031338

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Leo Jakšić

Karakterizacija poliklonskih antitijela IgY iz kokošjih jaja za protein CA 15-3 te njihova specifičnost za homologni protein u serumu kuja

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2016.

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Zavod za bolesti peradi s klinikom

Predstojnik: doc. dr. sc. Željko Gottstein

Mentori: doc. dr. sc. Željko Gottstein; doc. dr. sc. Dubravko Pavoković (PMF)

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Doc.dr.sc. Danijela Horvatek Tomić
2. Doc.dr.sc. Dubravko Pavoković
3. Doc.dr.sc. Željko Gottstein

Zahvaljujem svojim mentorima, doc.dr.sc. Dubravku Pavokoviću i doc.dr.sc. Željku Gottsteinu, koji su me strpljivo vodili kroz postupak pisanja ovog diplomskog rada, i dali mi priliku da steknem iskustvo u laboratorijskom radu, te koji su trpili moje požurivanje, naporna pitanja i nenajavljene dolaske.

Zahvaljujem doktorici Gordani Makar, svojoj mentorici na kliničkoj praksi, i njezinim kolegama koji su mi dali sjajno iskustvo u kliničkom radu, tretirali me sa poštovanjem i pružili mi sjajnu priliku da osobno radim u maloj klinici s pacijentima.

Također bih se zahvalio osoblju Veterinarskog fakulteta, teti Veri iz referade koja je često morala trpjeti moje neshvaćanje papirologije i procesa upisa i prijava, te svim doktorima i profesorima na fakultetu koji su mi pomagali pri učenju, pisanju i stjecanju iskustva na mom studiju. Posebne zahvale prof. dr. sc. Đuri Huberu, doc. dr. sc. Tomislavu Gomerčiću i osoblju Zavoda za biologiju na njihovoj potpori tijekom moje demonstature na njihovom zavodu, prof. dr. sc. Zoranu Milasu i osoblju sa Zavoda za zarazne bolesti na velikoj pomoći pri učenju i pripremanju za ispite iz njihovih kolegija, izv. prof. dr. sc. Krešimiru Severinu i Prof. dr. sc. Petru Džaji sa zavoda za sudsko i upravno veterinarstvo na samopouzdanju i savjetima koje su mi dali, te mnogim drugim djelatnicima koji su mi svojim savjetima i brigom omogućili produktivan studij.

Zahvaljujem se svojim kolegama studentima koji su mi davali podršku tijekom studija, i nadam se da sam uspio vratiti istu uslugu kada im je zatrebalo. Zahvaljujem svojoj obitelji na potpori u teškim vremenima i strpljenju koje su imali sa mnom. Bez svih Vas, ovaj završni korak bio bi neizvediv.

SADRŽAJ

1. UVOD 6

2. PREGLED LITERATURE

2.1. IgY PROTUTIJELA I NJIHOVA PRIMJENA 6

2.2. TUMORSKI ANTIGEN CA 15-3 11

3. MATERIJALI I METODE

3.1. IZOLACIJA IgY 13

3.2. ELEKTROFOREZA 15

3.3. WESTERN BLOT, MOKRI PRIJENOS 18

4. REZULTATI 19

5. RASPRAVA 22

6. ZAKLJUČAK 23

7. SAŽETAK 23

8. SUMMARY 24

9. POPIS LITERATURE 25

10. ŽIVOTOPIS 27

POPIS SLIKA I TABLICA

Slika 1. Usporedba strukture IgG i IgY, s podtipom IgY (ΔF_c) 8

Slika 2. Struktura MUC1 12

Slika 3. Akrilni gelovi nakon izvršene prve i druge elektroforeze 21

Slika 4. Membrane s uzorcima I.-III. nakon Western blot mokrog prijenosa 21

Slika 5. Membrane s uzorcima IV.-VI. nakon Western blot mokrog prijenosa 22

Tablica 1. Gelovi za mali sustav elektroforeze 15

Tablica 2. Otopina za pripremu gelova za elektroforezu 16

Tablica 3. Puferi za mokri prijenos Western blotting 17

Tablica 4. Uzorci seruma kuja u puferu za uzorke 17

Tablica 5. Usporedba Bradford i NanoDrop metode za određivanje koncentracije IgY 19

Tablica 6. Izračun koncentracija uzoraka za elektroforezu 20

1. UVOD

Protutijela su molekule koje stvaraju B limfociti kao odgovor na podražaj antigenom, što može biti bilo koja čestica koju imunološki sustav ne prepoznaje, i uglavnom je tu riječ o virusnim, bakterijskim ili parazitarnim proteinima, a prema njima su protutijela strukturno-specifično oblikovana. Protutijela se u medicini, kako u humanoj tako i u veterinarskoj, izoliraju i koriste u dijagnostici, liječenju i proizvodnji već godinama. U kokoši su izdvojene sljedeće skupine protutijela: IgM, IgA i IgY. IgA i IgM su strukturno slični istoimenim protutijelima u sisavaca, dok su IgY protutijela analogna IgG protutijelima. Na postojanost sisavičjih IgE i IgD analoga u ptica se sumnja, ali trenutno njihova prisutnost u ptica nije dokazana. Sva su ta protutijela produkti B limfocita koji sazrijevaju u Fabricijevoj burzi u ptica.

U sklopu ovog rada pažnju ćemo usmjeriti strukturi i koristi IgY protutijela, konkretno njihovoj koristi i praktičnoj aplikaciju u detekciji tumora dojke u kuja.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. IgY PROTUTIJELA I NJIHOVA PRIMJENA

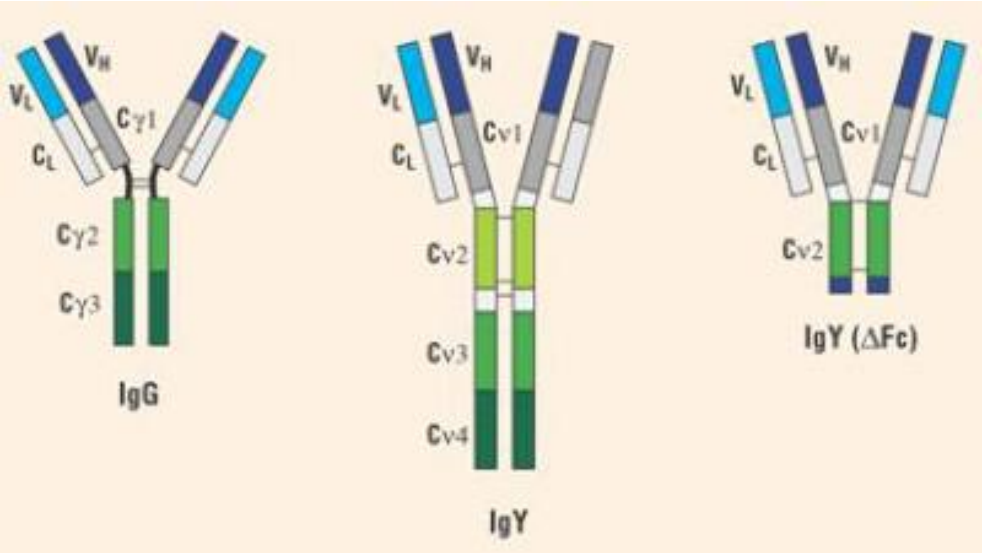
IgY su dominantni oblik protutijela u ptica, gmazova i nekih oblika riba, poput dvodihalica, i glavni su prenosioci humoralne imunosti. Prvi puta su otkrivene 1969. kao oblik protutijela analogan IgG protutijelima u sisavaca, no s drugačijom strukturom i svojstvima, pa su stoga nazvane IgY (od engleske riječi *yolk*, žumanjak). Kao i sva protutijela, IgY proizvode B limfociti iz V-C gena, koji ih neprestano sintetiziraju i otpuštaju u krvotok (prosječno 5-7 mg/ml seruma), no najvećim dijelom se odlažu upravo u žumanjak jajeta. U kontrastu tome, IgM i IgA protutijela se mogu naći u bjelanjku (0,15-0,7 mg/ml za svaku od njih), ali su gotovo nepostojeća u žumanjku.

Njemački internist imenom dr. Felix Klemperer u svom je pokusu 1893. godine dokazao da imuniziranje kokoši rezultira prijenosom antitijela iz seruma kokoši u žumanjak (R. SCHADE, H. R. TERZOLO, 2006). Zbog toga je korištenje IgY protutijela u medicini ekonomičnije i isplatljivije u odnosu na korištenje drugih klasa protutijela. Njihova nabava je isplatljivija jer se u prosjeku kokoši jeftinije nabavljaju od pokusnih sisavaca, no što je još bitnije je da je jedna kokoš bogatiji i bolji izvor protutijela od sisavca slične veličine, recimo zečeva. Protutijela IgY neprestano se talože u žumanjku jajeta koje kokoši nesu, u daleko

većim količinama nego li se, recimo, IgG protutijela nabavljaju od sisavaca. U prosjeku se u jednom žumanjku nalazi 50-100 mg IgY protutijela (W. D. DA SILVA, D. V. TAMBOURGI 2010.), i uzevši u obzir da kokoši nesilice nesu oko 20 jaja mjesečno, to nam daje 1-2 g IgY protutijela na mjesec, a izmjerena je produkcija 17-40 g IgY protutijela na godinu (R. SCHADE, H. R. TERZOLO, 2006.; J. KOVACS-NOLAN, Y. MINE, 2004.), što je jednako produkciji 40 zečeva. Nabavljanje i izdvajanje tih protutijela je lakše pošto je manipulacija životinjama manje bolna i manje stresna.

Količina i ponašanje IgY antitijela ovisi o načinu imuniziranja kokoši nesilica. U pravilu nakon imuniziranja, IgY molekule se mogu izdvojiti iz žumanjka 13. dana, a maksimalnu koncentraciju dosežu 41. dan (G. NIKBAKHT & co., 2012.), no DA SILVA i TAMBOURGI (2010.) navode kako su kokoši imunizirane intramuskulaturnom injekcijom protutijela oslobađala tek 28. dana, no da su nastavile s produkcijom protutijela kroz 200 dana, i da su ta antitijela dala 10 puta specifičniji odgovor nego u kokoši koje su imunizirane subkutano. Dok se nalaze u žumanjku, IgY protutijela su u principu slobodna, sve do 7.-18-tog dana inkubacije kada prijanjaju na receptore žumanjčane vrećice, koji se vežu za Fc vrhove molekula, prvo na one slabijeg, pa onda receptore većeg afiniteta. U pilića sekrecija IgY protutijela u krvotok započinje 6. dana inkubacije (W. D. DA SILVA, D. V. TAMBOURGI 2010.). Sve u svemu, koncentracija IgY protutijela u jajetu ovisi o zdravstvenom stanju kokoši (konstituciji, građi, hranidbi), starosti jaja i vremenu nesenja, samoj količini žumanjka, i koncentraciji IgY protutijela u serumu kokoši (H. SUN & co., 2013.).

Same IgY molekule su prilično otporne, te ostaju stabilne na visokom rasponu temperature i pH, zbog čega je baratanje njima, kao i čuvanje protutijela nakon izolacije, uvelike olakšano. Smrznute na -20 °C, mogu sačuvati svoje sposobnosti vezanja za antigene još mjesecima, pa čak i godinama ako su čuvane na temperaturi frižidera u otopini soli NaCl-a i NaN_3, te do mjesec dana pri čuvanju na 37°C. Međutim, nisu stabilne na temperaturama višim od 70 °C i pH nižim od 4,0.



Slika 2: Usporedba strukture IgG i IgY, s podtipom IgY (ΔF_c)

(http://www.good-biotech.com/about_us/index.php?id=15)

Svojom su strukturom sliče IgG protutijelima u sisavaca, no postoji nekoliko razlika, prije svega to što između ta dva protutijela nema unakrižnih interakcija unatoč strukturalnoj sličnosti. Sva protutijela su građena od teških i lakih lanaca proteina, koji su međusobno povezani disulfidnim mostovima i između kojih se nalazi područje za vezanje antigena. No, dok se laki lanci u ova dva razreda protutijela u principu nerazlikuju, teški je lanac dulji i manje fleksibilan u IgY protutijela, a sačinjava ih 5 domena (4 u IgG obliku): V_H, C_H1, C_H2 (koji, unatoč imenu, nema analoga u IgG molekuli), C_H3, i C_H4. Zbog toga IgY imaju veću molekularnu masu (u prosjeku 167-250 kDa). Oba tipa protutijela sadrže Asn-vezane oligosaharide, ali njihova je struktura drugačija, i u IgY ih čini monoglukolizirana oligomanoza. Poput IgG, IgY prenose humoralnu imunosnu zaštiti, ali isto tako sudjeluju i u reakcijama anafilaktične preosjetljivosti, što je svojstvo IgE protutijela. Zbog ove sličnosti između IgE i IgG, IgY se smatra izvornom, odnosno matičnom strukturom od koje su te dvije klase protutijela nastale u sisavaca.

U nekih ptica, primjerice patke, izdvojen je još jedan oblik IgY protutijela, zvan IgY (ΔF_c) sa skraćenim dugim lancem u kojem su domene C_H3 i C_H4 odsutne. Ta skraćena protutijela ne vežu komplement, i ne prihvaćaju se za makrofage, što se smatra razlogom za povećanu osjetljivost pataka na viroze i druge infekcije u odnosu na drugu perad (D. HAJSIG & co., 2013.).

Zbog toga što je ovakav tip protutijela domanantan u ptica a ne u sisavaca, IgY molekule posjeduju svojstva koja su u njihovoj primjeni u medicini od neizmjerne važnosti: ne

aktiviraju sustav komplementa u krvotoku sisavaca, ne reagiraju s reumatoidnim faktorom, ni s „antimouse-IgG“ protutijelima u ljudi, niti s bakterijskim receptorima, te nemaju heteroaglutinine. Zbog svega navedenoga ne dolazi do neželjenih interakcija drugih molekula ili intervencije imunološkog sustava domaćina kada se IgY protutijela primjenjuju u praksi, ili kada se pripremaju i koriste u laboratorijskom radu.

Jedini nedostatak rada s IgY protutijelima jest problematično izdvajanje molekula iz žumanjka, zbog toga što je teško izdvojiti molekule proteina od daleko mnogobrojnijih lipida (u prosjeku 35% žumanjka čine lipidi, a tek 15% proteini). Prema tome, sadržaj žumanjka je potrebno prvo delipidizirati. Isto tako je bitno za napomenuti da prilikom izdvajanja molekula, svojstva kemikalija i postupci moraju razdvojiti ciljane proteine u što većoj koncentraciji, sa što većom čistoćom, a da pri tome ne utječu na svojstva protutijela niti njihovu strukturu.

Postoji više metoda, no u ovom istraživanju koristili smo metodu polietilen glikol (PEG) precipitacije, u kojoj se žumanjak pažljivo odvaja i crpi iz žumanjčane vrećice, i potom se različite molekule razdvoje u tri koraka koja uključuju centrifugu i inkubaciju, koristeći PEG kao precipitant u otopini. Metoda je relativno jednostavna, daje visoke udjele pročišćenih imunoglobulina, i efikasna je zbog toga što PEG ostaje stabilan kao precipitant na sobnoj temperaturi.

Bhanushalijeva metoda (S. H. TAN & co., 2012.) uključuje razrjeđivanje žumanjka 10 puta u destiliranoj vodi, inkubaciju otopine preko noći i odvajanje IgY iz supernatanta centrifugom, pa potom ponovno centrifugom nakon izlaganja amonijevom sulfatu ($(NH_4)_2SO_4$), i napokon podvrgnuti dijalizi u otopini NaCl-a.

Slična metoda uključuje otapanje žumanjka u vodi, inkubaciju na 4°C, centrifugiranje i miješanje supernatanta s otopinom natrijeva sulfata (Na_2SO_4), nakon čega su se IgY protutijela iz taloga izdvajaju raznim metodama, uključivši ultrafiltraciju, precipitaciju solju Na_2SO_4 ili alkoholom, gel filtraciju i kromatografiju izmjene aniona. Prema radu E. M. AKITE i S. NAKAI (1992.), u kojem su tu metodu uspoređivali s tri druge, uključivši i PEG precipitaciju, tu su metodu vodene dilucije smatrali boljom jer je rezultiralo čišćim uzorkom IgY protutijela u manje koraka. Smatraju da bi implementacija PEG-a u istu metodu moglo čitav postupak učiniti još isplatljivijim.

Druge metode uključuju ultrafiltraciju, precipitaciju i ekstrakciju kloroform-polietilen glikolom, polianioničnim polisaharidima poput ksantana, dekstran sulfatom, etanolom, amonijevim sulfatom, propanolom, kapriličnom kiselinom, te prirodnim gumama poput

pektina, natrijeva alginata, u kombinaciji s nekoliko vrsta kromatografije, zatim smrzavanje i otapanje žumanjka, pri čemu se olakšalo centrifugalno odvajanje lipidnih agregata. Za jednostavniji pristup na tržištu postoje tvornički kitovi za purifikaciju IgY (najrašireniji su Thermo Pierceov Eggcellent™ i Promegin EGGstract®), koji omogućuju efikasnu purifikaciju do 70-90% čistih IgY protutijela, ali su isto tako i relativno skupi.
SOCK HWEE TAN i suradnici (2012.) su predstavili jedan efikasan način izdvajanja koji je relativno jeftin, koristeći kombinaciju pektina i κ-karagenana u prisutnosti kalcijeva klorida ($CaCl_2$) kao agent za delipidizaciju, te amonijev sulfat kao precipitativni agens. Njihovi rezultati pokazuju da je metoda u pogledu cijene i omjera pročišćenih IgY bolja od tvorničkih kitova.

IgY protutijela imaju široku primjenu u dijagnostici i terapeutici, primjerice u liječenju proljeva uzrokovanog bakterijom *Helicobacter pylori*, koji je inače relativno otporan na antibiotike, koristeći IgY protutijela da blokiraju enzim ureazu koju *H. pylori* proizvodi. Isto tako se koriste u profilaksi bolesti povezane za zubnu njegu, terapija zaraznih bolesti crijeva i kolitisa, liječenje bolesti uzrokovane *E. coli, Salmonella enteritidis et typhimurium, Campylobacter jejuni,* kao i koronavirusom i rotavirusom u prasadi, teladi i miševa pasivnom administracijom protutijela, a imaju i posebno bitnu primjenu u neutralizaciji toksina korištenih u bioterorističkim napadima (primjerice ricin i botulin toksin) (R. SCHADE, H. R. TERZOLO, 2006).

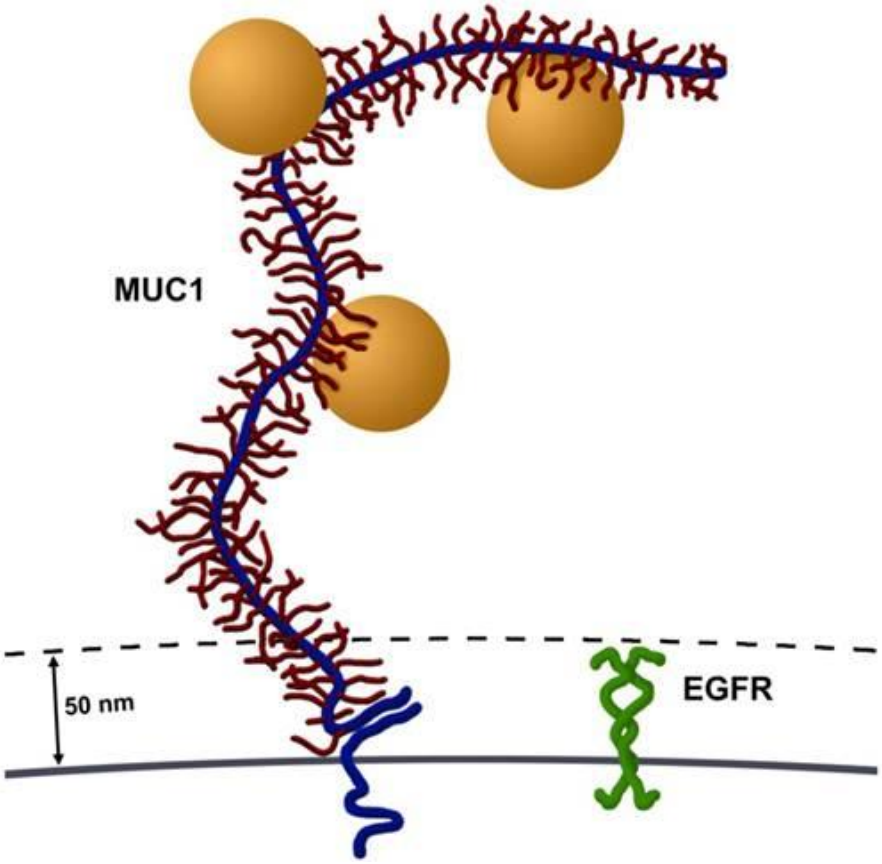
Ono što je za ovaj rad bitno za napomenuti jest njihova primjena u imunologiji kao detektori antigena životinjskog, biljnog i bakterijskog porijekla, te u mjerenju količine proteina ELISA-om. Ukratko, ELISA je metoda kojom se određuje količina antigena (u ovom slučaju proteina) prema njihovom vezanju na antitijela koja su vezana za podlogu. Što ima više antigena, broj zauzetih mjesta na protutijelima će biti veći, što se na kraju može izraziti kromatografijom. U slučaju ovog istraživanja, takva metoda korištena je za određivanje vezanja IgY protutijela za tumorski antigenski marker CA 15-3.

2.2. TUMORSKI ANTIGEN CA 15-3

Tumor mliječne žlijezde je najučestalije dijagnosticirana novotvorevina u kuja (u prosjeku se dijagnosticira u 26-73% slučajeva malignih tvorevina), te najučestaliji je oblik raka u žena, kao i značajan uzrok uginuća u veterinarskoj i humanoj medicini (u prosjeku uzrokuje 500 000 smrti žena godišnje). Prema tome, detekcija tumora u ranijoj fazi je od velike važnosti u dijagnostici i tretmanu pacijenata. U kuja se najčešće javljaju u dobi od 8-10 godina, a predispozicionirane pasmine uključuju pudlice, engleskog koker-španijela, engleskog setera, jazavčara i terijere, dok su bokseri, čivave i biglovi slabije predisponirani za pojavu karcinoma mliječne žlijezde. U 65% slučajeva tumori se javljaju u kaudalnim regijama, a drugi faktori koji utječu na pojavnost tumora su povišena hormonalna aktivnost, lažna trudnoća i mastopatije. Mliječne žlijezde sačinjava širok spektar različitih stanica, no većina tumoroznih tvorbi na mliječnim žlijezdama su identificirani kao epiteliozni karcinomi (V. LEDECKY & co., 2013.).

Nakon dijagnoze, prognoza bolesti ovisi o stadiju tumora i njegovoj rasprostranjenosti po tijelu, a terapija se uglavnom svodi na kirurški zahvat, popraćen kemoterapijom, zračenjem ili hormonskom terapijom.

Antigen CA 15-3 je solubilna varijanta mucina 1 (MUC1), transmembranskog glikoproteina sastavljenog od 2 podjedinice koje formiraju stabilni dimer. Amino-terminalna podjedinica posjeduje 25-100 sekvenci ponavljajućih tandema koji se mogu modificirati glikolizacijom, kojom su podložni i tandemi na manjoj karboski-terminalnoj podjedinici. Nalazi se na membrani epitelnih stanica dojki, bubrega, mokraćnog mjehura, jetre, želuca i respiratornog trakta. U zdravih stanica, MUC1 ima ulogu prenošenja staničnih signala korištenjem medijatorskih protein kinaza (c-src, EGFR, HER-2, protein kinaza c delta) i ne-kinaznih proteina (beta-katenin, GRB-2, estrogen receptori), kao i hidraciji i zaštiti vanjskih membrana epitelnog tkiva. Molekule MUC1 koje potječu iz različitih tkiva su različito glikolizirane, što se može uzeti u obzir pri dijagnosticiranju tumora na određenim organima. Pri transformaciji stanica iz normalnog epitela u tumorske stanice gubi se apikalna orijentacija mucina, te se povećava udio MUC1 koji ima drugačiji uzorak glikolizacije od zdravih stanica. Karboksi-terminal utječe na signalizaciju u stanici i time pospješuje proliferaciji tumora, dok amino-terminal utječe na adhezijske proteine poput ICAM-1. Oslobađanje MUC1 od membrane uvjetuju dva proteolitička enzima: ADAM17 i MT-MMP1. Kada se oslobodi u krvotok, deglikolizira se i postane topiv, što onda nazivamo CA 15-3 antigenom (M. J. DUFFY & co., 2010.).



Slika 2: Struktura MUC1

(http://www.thno.org/v02p0777.htm)

CA 15-3 (*cancerous antigen 15-3*) jest ugljikohidratni antigen velike molekularne mase (300-600 kDa), koji se učestalo koristi kao marker za rak dojke u ljudi i pasa. Za takve markere vrijedi jedno pravilo: njihova je količina proporcionalna negativnom iskazu prognoze pacijenata. To znači da se veličina tumora, stadij bolesti i prisutnost metastaza odražavaju u koncentraciji markera CA 15-3. Učestalo se nalazi u serumu pacijenata kojima je dijagnosticiran rak dojke, pogotovo u slučajevima metastaza. No, bitno je za napomenuti da mu je antigena specifičnost relativno slaba u ranijoj fazi bolesti. Zbog toga se ne koristi toliko kao marker za prvotnu dijagnozu, već ima važniju ulogu u monitoringu pacijenata nakon operativnog zahvata, pri čemu će koncentracija antigena odražavati uspjeh terapije. U tom slučaju specifičnost mu je relativno visoka. Isto tako će koncentracija CA 15-3 biti povišena ne samo kod raka dojke, već i kod prisutnosti karcinoznih tvorevina na gušterači, plućima, jajnicima, endometri, bubrezima i duž gastrointestinalnog trakta. Lagano povišenje CA 15-3

može se uočiti u slučajevima benignih tvorbi dojke, kod ciroze jetre, kroničnog hepatitisa, sistemskog lupusa erythematosusa, sarkoida, tuberkuloze, upalne bolesti, hipotiroidizma i megaloblastične anemije. Uz njega, za detekciju tumora se mogu koristiti i drugi antigeni markeri, poput CEA, TPA i TPS (R. GRYZWA & co., 2013).

CA 15-3 se može vezati za monoklonalna DF3 protutijela, i to svojstvo se može koristiti za detekciju u serumu (E. MANUALI & co., 2012.; M. C. MARCHESI & co., 2010.). CA 15-3 se može komercijalno naći u obliku ELISA sendviča, gdje reagira s različitim monoklonalnim protutijelima, što su obično DF3 i 115D8.

Korištenjem CA 15-3 kao marker, dijagnoza bi se trebala olakšati, i mada postoje mnoge metode, primjerice kemijska biolumnescencija, u ovom smo radu istraživali da li je moguće olakšati dijagnostiku bolesti korištenjem IgY protutijela kao markera za ELISA-u mokrom metodom Western blottinga.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom istraživanju, IgY protutijela su izdvojena iz žumanjka jaja imuniziranih kokoši metodom precipitacije polietilen glikola (PEG).

Kokoši su prethodno imunizirane antigenom CA 15-3, koji služi kao marker za rak dojke u ljudi i u pasa.

3.1. IZOLACIJA IgY

Selektirano je 13 jaja snešeno u razdoblju od 13.05. do 20.10.2014. godine, koja su imala u prosjeku 13 ml žumanjka. Jaja su pažljivo otvorena, bjelanjak je bio izdvojen i odstranjen, a žumanjak potom osušen laganim rolanjem po čistom filter papiru. Lancetom je probijena kožica žumanjka i sadržaj je preliven u tubicu, pri čemu je izmjeren volumen žumanjka (V1). Tome je dodan dvostruko veći volumen PBS-a (V2=2xV1), a zatim je dodan PEG 6000 u 3.5% iznosu od sveukupnog volumena (V1+V2) u prahu. Radi lakšeg računanja, u tubice s manje žumanjka je dodano još PBS-a tek toliko da ukupni volumen bude isti u svim tubama. Sadržaj tuba je izmiješan na vorteksu, i zatim su stavljene na valjanje na roler kroz 10 minuta.

Time smo razdvojili suspenziju na 2 faze: vodenastu, koja sadrži proteine i protutijela, i gušću, koju sačinjavaju krute i masne substance iz žumanjka. Te dvije faze su potom

odvojene centrifugom (na 4°C, 5700 okretaja u minuti kroz 35 minuta, odnosno 6700 okretaja kroz 30 minuta). Supernatant je profiltriran kroz filter papir i prenešen u nove tubice, pri čemu je opet izmjeren volumen (V3). Dodano je 8.5% PEG-a u prahu, te je kao i prije dodano još PBS-a u tube s manjim volumenom radi lakšeg baratanja s PEG-om. Tube su opet vorteksirane i valjane 10 minuta.

Potom su tube opet centrifugirane (13000 okretaja u minuti kroz 20 minuta, na 4°C), no ovoga puta je supernatant izliven, a talog pažljivo otopljen u 1ml PBS-a uz pomoć staklenog štapića. Nadoliveno je 9 ml PBS-a, tako da je finalni volumen svih tuba bio 10 ml. Tome je dodano 1.2 grama PEG 6000 u prahu (dakle, 12%). Te su tube vorteksirane, valjane 10 minuta, i centrifugirane kao i zadnji put.

Nakon centrifuge, supernatant je izliven, a talog je otopljen u 800 µl PBS-a uz pomoć staklenog štapića. Potom je ektrakt iz svake tubice izpipetiran i prenešen u membrane za dijalizu, dodano je 400 µl PBS-a, i stavljeno u frižider na 4°C na magnetnoj mješalici u 0.1% otopini NaCl-a preko noći. Sljedećeg dana solna otopina je zamjenjena 10%-nom otopinom PBS-a i dalje miješano još 3 sata. Nakon toga, iz svake membrane je izpipetirano 900 µl ekstrakta protutijela i prenešeno u epruvete. One su vorteksirane, i nakon stajanja iz svake epruvete je pipetom trećina sadržaja (dakle, 300 µl) prenešena u kapsule sa stožastim dnom, koje su potom označene. Takve kapsule su se mogle pohraniti u zamrzivač na -20°C, i sadržavale su izdvojena protutijela iz žumanjka jaja.

Koncentracija protutijela je potom izmjerena za svaki uzorak koristeći metodu određivanja proteina po Bradfordu, a kasnije i NanoDrop spektrofotometrom. To je učinjeno kako bi se usporedila točnost te dvije metode.

Bradfordova metoda se temelji na povezivanju proteina s anionskim oblikom boje *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250, koja se maksimalno absorbira na valnoj duljini od 595 nm. U ovoj metodi je u 1 ml Bradfordove otopine otopljeno 10 µl uzorka, pri čemu je PBS korišten kao slijepa proba. Otopine su stavljene u spektrofotometar, čime je izmjerena absorbanca. Koncentracija proteina (µg/ml) je određena preko baždarne krivulje za metodu Bradford preko proteina BSA.

NanoDrop spektrofotometar je uređaj koji određuje koncentraciju proteina u relativno malom uzorku (kapljica od 2µl) koristeći površinsku napetost tekućine da formira kapljicu koju uređaj koristi kao uzorak. Za razliku od Bradforda, NanoDrop koristi internu baždarnu krivulju iz algoritma u uređaju, i to na 260 nm. (Tablica 5.)

3.2. ELEKTROFOREZA

Elektroforeza označava gibanje čestica u električnom polju, čija pokretljivost ovisi o jakosti električnog polja, naboju, veličini i obliku čestica, te svojstvima medija u kojem se one gibaju, prije svega temperatura, viskoznost i pH. Koristeći SDS kao medij, koji ima svojstva da otopi, denaturira i disocira proteine u zasebne polipeptidne lance u prisutnosti reagensa za razaranje difuznih veza, efektivno je odbačena ovisnost elektroforeze o naboju čestica, jer on u tom slučaju ostaje u principu konstantan. Stoga se elektroforetsko razdvajanje svodi samo na promjer i oblik molekula.

Pri pripremi za elektroforezu, pripremljeni su ekstrakti uzoraka pri čemu se izračunalo koliki dio uzorka mora biti prebačen u jažice da bi imali 10 µg protutijela po jažici. Za tu svrhu korišteni su rezultati dobiveni NanoDrop metodom, prema formuli V=m/c (volumen uzorka jednak je masi 10µg, podjeljeno s koncentracijom uzorka). Kako se u elektroforezi radilo s otopinom od 20µl, prvo se izračunala koncentracija potrebna da se iz otopine od 4µl dobije jednak udio protutijela u 20µl, prema sljedećoj formuli:

$$c1xV1 = c2xV2 \rightarrow c2 = (c1xV1)/V2 \rightarrow c2 = (c1 \times 4\mu l)/ 20\mu l \rightarrow c2 = c1/ 5$$

Dakle, u elektroforezi se koristila 5 puta manja koncentracija nego li je izmjereno NanoDrop metodom. (Tablica 6.)

Tablica 1: Gelovi za mali sustav elektroforeze

Gel za razdvajanje (12%-tni)		**Gel za koncentriranje (4%-tni)**	
redestilirana voda	3,35 mL	redestilirana voda	3,050 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,50 mL	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,250 mL
AA/Bis AA	4,00 mL	AA/Bis AA	0,665 mL
10%-tni SDS	100 µL	10%-tni SDS	50 µL
10%-tni APS	50 µL	10%-tni APS	35 µL
TEMED	5 µL	TEMED	8 µL

Protutijela su prebačena na gelove metodom elektroforeze (SDS-PAGE). Nakon pripreme i polimerizacije gelova (akrilamid i bis-akrilamid), postavljena je aparatura za elektroforezu stavljanjem ploča s gelovima na elektrodni nosač, a između ploča je uliven svježi 1X elektrodni pufer. Uzorci seruma kuja koji su sadržavali željeni marker CA 15-3 su pomiješani u puferu za uzorke. Riječ je o tri različita seruma, od koji se svaki trebao primiti na jednu kolonu na traci s uzorcima IgY (Tablica 4.).

Uzorci su preneseni čvrstom iglom Hamilton (najviše 30 µl uzoraka po jažici gela). Pri tome je volumenu V1 otopina dodano 16µl pufera za otopinu, potom podloženo mikrocentrifugi (spin-down) 10 sekundi, i u termomikseru na 96°C kroz 5 minuta.

Elektroforeza se vršila na 100 V , a kroz 15 minuta postepeno je voltaža povišena na 180, 190 i na kraju 200 V kroz još 45 minuta.

Tablica 2: Otopina za pripremu gelova za elektroforezu

10 x elektrodni pufer	
0,25 M Tris	30 g
1,92 M glicin	144 g
10%-tni (w/v) SDS	10 g
6,0 M HCl	do pH 8,3
redestilirana voda	do 1 L

Tablica 3: Puferi za mokri prijenos Western blotting	
Pufer za prijenos	
28 mM Tris	3,35 g
192 mM glicin	14,4 g
10% (v/v) metanol	100 mL
6 M HCl	do pH 8,3
destilirana voda	do 1 L
Pufer 10 x TBS (Tris-buffered saline)	
0,2 M Tris	24,2 g
0,73 M NaCl	80,0 g
6 M HCl	do pH 7,5
destilirana voda	do 1 L
Pufer 1 x TBS	
10 x TBS	100 mL
destilirana voda	do 1 L
Pufer TTBS	
0,1% (v/v) Tween 20	1 mL
1 x TBS	do 1 L

Membrane su stavljene u CBB boju, i inkubiraju se na roleru kroz 1-2 sata. CBB je nepolarna sulfatirana *Coomassie* boja, izvorno korištena za bojanje u industriji vune, koja se u kiseloj sredini elektrostatskim silama veže za aminoskupine proteina.

Tablica 4: Uzorci seruma kuja u puferu za uzorke		
Oznaka seruma	Šifra seruma	Datum izdvajanja seruma
1.	B-9	13.08.2014.
2.	B-5	08.08. 2014.
3.	A-7	23.08.2014.

3.3. WESTERN BLOT, MOKRI PRIJENOS

S gelova su na nitroceluloznu membranu IgY protutijela prenešena metodom *Western blota,* točnije mokrim prijenosom *(wet blotting)*. To se vrši tako da se u okvir za elektrolizu sastavi "sendvič" kojeg čine rešetka, spužva, filter papir, nitrocelulozna membrana, gel s IgY antitijelima, zatim opet filter papir, spužva i okvir. Svi ti dijelovi bili su natopljeni u puferu za prijenos. Iz konstrukcije je izbijen zrak, i dodano je hladilo prije uključivanja na elektroforezu, i to na 60 V i 270 mA kroz 60 minuta.

Korišten je pufer za prijenos (Tablica 3.) Nakon elektroforeze i prijenosa IgY protutijela na membrane, one su tretirane puferom za blokiranje, kojeg je činilo 50 ml TBS-a, 0,5% masnog mlijeka u prahu u količini 4% otopine (dakle, 2g) i 0,5% deterđenta Tween 20 (0,25 ml). To je izvršeno kako bi se blokirala slobodna mjesta na membrani koja nisu bila u kontaktu s protutijelima, kako se ti dijelovi membrane ne bi obojali.

Nakon prijenosa membrane su natopljene u boju Rouge Ponceau S, rolane 5 minuta , nakon čega je boja izlivena, membrane isprane destiliranom vodom, označene olovkom, isprane TBS-om, i stavljene u pufer za blokiranje preko noći (10 ml pufera po membrani). Napomenut ćemo da su tijekom procesa u puferu pronađene nečistoće, koje su uklonjene filtracijom.

Otopinu za primarna i sekundarna protutijela čini 2% mlijeko u prahu s 0,5% mliječne masti (dodano da otopina bude gušća i da se bolje zalijepi) otopljeno u 50 ml TTBS-a, kojeg čini 0,5 l TBS-a i 500 µl Tweena 20. Pufer s membranama je ispran s po 10 ml TTBS-a, dvaput kratko, jednom kroz 15 minuta, i četri puta 5 minuta.

Membrane s označenim protutijelima su izrezane i prebačene svaka u zasebnu petrijevu zdjelu s otopinom za antitijela, uz 6 µl uzoraka I, II, III, IV, V i VI, koji su korišteni kao primarna protutijela. To je stavljeno na roler kroz 2 sata. Nakon valjanja, petrijevke su isprane s TTBS-om kao i u prethodnom postupku. Nakon ispiranja, dodano je u svaku Petrijevku po 8 ml otopine za protutijela, i po 2 µl otopine anti-kokošjih IgY (IgG) protutijela. Stavljeno je na roler kroz 2 sata, i potom isprano 4 puta s TTBS-om kroz 5 minuta, i onda kratko s destiliranom vodom. Količina IgY koje je reagiralo sa CA 15-3 u serumu je vizualizirano sa komercijalnim tabletama NBT/BCIP, 2 ml po membrani.

4. REZULTATI

Pri mjerenju koncentracije proteina, primjećena je značajna razlika u iznosima dobivenim metodom Bradford i NanoDrop (Tablica 4). Koncentracija proteina izmjerena NanoDropom dala je 2-7 puta veće vrijednosti od one izmjerene Bradford metodom, s otprilike podjednakim odnosima vrijednosti između uzoraka. Srednja vrijednost koncentracije proteina iznosila je 1640 μg/ml u Bradfordovoj metodi, odnosno 6768 μg/ml u NanoDrop metodi. Uzrok tako dramatičnoj razlici nije poznat, no smatra se da ulogu igraju proteini u tragovima koji su interferirali s bojama u kromatografiji. U oba slučaja uzorak IV. je imao najvišu koncentraciju proteina, a uzorci VI. i XIII. najmanju. Koncentracija uzoraka VI. i XIII. je bila toliko niska da smo tijekom prijenosa uzorka za elektroforezu udvostručili izvornu dozu uzorka, ne bismo li prenijeli više protutijela.

Tablica 5: Usporedba Bradford i NanoDrop metode za određivanje koncentracije IgY

uzorak	datum snešenog jajeta	**metoda Bradford**		**metoda NanoDrop**
		apsorbancija (nm)	koncentracija (μg/ml)	izmjerena koncentracija (μg/ml)
I.	18.-20.10.'14.	752	1444	4788
II.	18.-20.10.'14.	672	1290	3723
III.	07.10.'14.	908	1743	6219
IV.	07.10.'14.	1112	2136	13898
V.	07.10.'14.	999	1918	8920
VI.	28.08.'14.	434	834	1832
VII.	01.09.'14.	650	1248	3555
VIII.	16.10.'14.	913	1754	6891
IX.	28.09.'14.	1030	1979	9073
X.	28.09.'14.	1036	1989	8693
XI.	15.10.'14.	1006	1931	9212
XII.	15.10.'14.	1014	1947	8818
XIII.	13.05.'14.	577	1108	2358

Tablica 6: Izračun koncentracija uzoraka za elektroforezu

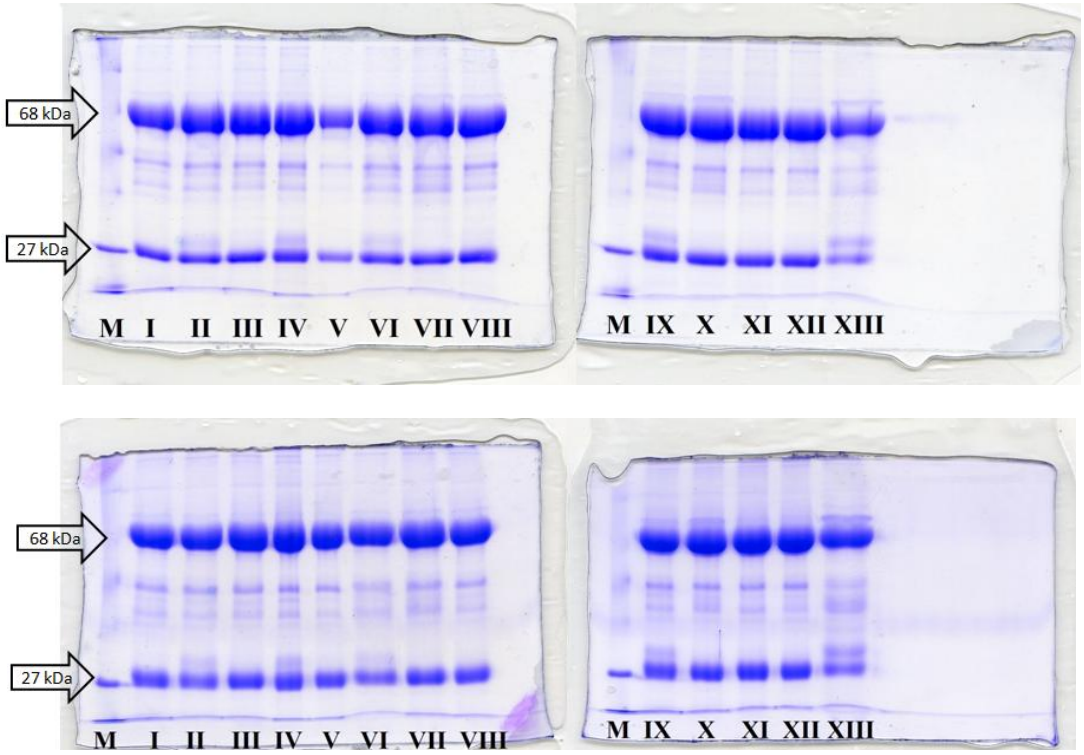
uzorak	koncentracija c2 (µg/µl)	volumen uzorka za elektroforezu s 10µg protutijela (µl)
I.	0,9576	10,44
II.	0,7446	13,43
III.	1,2438	8,04
IV.	2,7694	3,61
V.	1,7840	5,61
VI.	0,6107*	16,37*
VII.	0,7110	14,06
VIII.	1,3782	7,26
IX.	1,8146	5,51
X.	1,7386	5,75
XI.	1,8424	5,43
XII.	1,7636	5,67
XIII.	0,7860*	12,72*

*uzorci koji su davali neuobičajeno niske koncentracije, stoga je prethodno udvostručen V1 s 4µl na 8µl i proveden klasičan izračun;

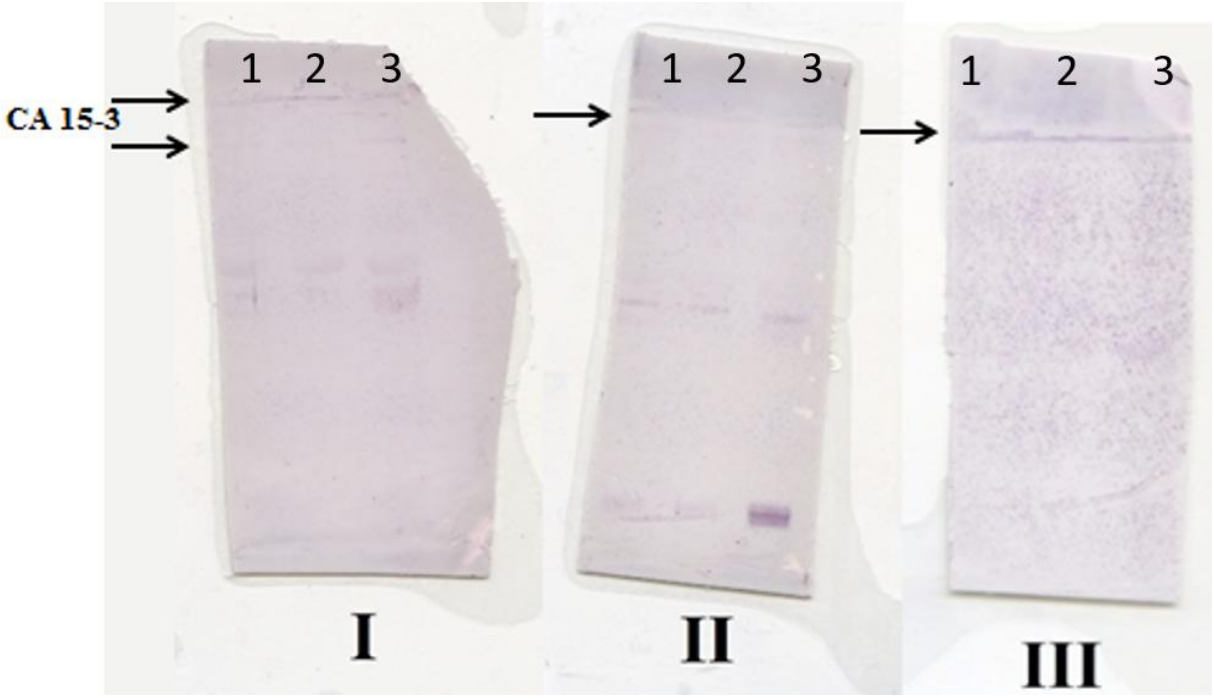
Kroz dvije elektroforeze protutijela su uspješno prenesena iz uzoraka na membrane, razdvajajući ih pritom na teške (68 kDa) i na lake lance (27 kDa) (Slika 3). Koncentracija proteina u oba slučaja je otprilike podjednako izražena, no opet su najslabije reagirali uzorci V., VI. i XIII., unatoč dvostruko većoj količini uzorka.

Nakon mokrog prijenosa, reakcija protutijela i antigena može se vidjeti u obliku tamih obojanih linija na trakama membrana. Na membranama se vide razne linije gdje su protutijela IgY reagirala s drugim antigenima, tj. drugim proteinima u serumu (Slika 4. i 5.). Kako su korištena poliklonalna protutijela, nije neočekivano to da su ona reagirala na proteine u serumu koji nisu bili ciljani marker. Primijećeno je da je uzorak III. najbolje reagirao na izlaganje tumorskom markeru, pošto se na toj membrani vidi precipitacija čestica po skoro cijeloj površini, no markerska linija za reakciju s antigenom CA 15-3 ostala je uočljiva. To

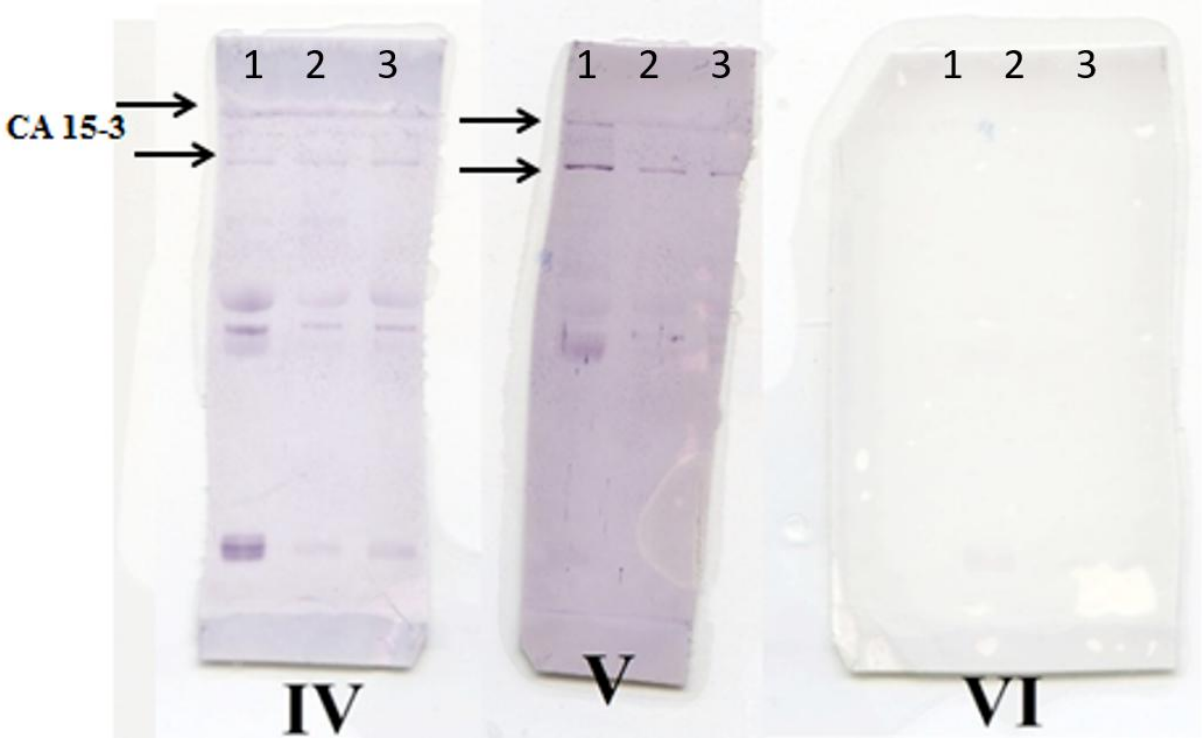
znači da je izdvojeno protutijelo reagiralo specifično na taj protein, što ga čini najboljim uzorkom u toj skupini. Uzorak VI. nije reagirao i smatramo ga negativnim rezultatom.



Slika 3: Akrilni gelovi nakon izvršene prve i druge elektroforeze. M je slijepa proba. Na slikama su strelicama na lijevoj strani naznačene veličine molekula koje prikazuju teške (68 kDa) i lake lance (27 kDa).



Slika 4: Membrane s uzorcima antitijela IgY I.-III. nakon Western blot mokrog prijenosa. Strelice označavaju mjesta spajanja markerskog antigena s teškim i lakim lancima IgY protutijela. Arapski brojevi označavaju broj seruma.



Slika 5: Membrane s uzorcima antitijela IgY I.-III. nakon Western blot mokrog prijenosa. Strelice označavaju mjesta spajanja markerskog antigena s teškim i lakim lancima IgY protutijela. Arapski brojevi označavaju broj seruma.

5. RASPRAVA

Istraživanje je dokazalo da je moguće izdvojiti IgY protutijela i prilagoditi ih da se specifično vežu na određene antigene prethodnom imunizacijom kokoši. PEG precipitacijska metoda se pokazala uspješnom u izdvajanju antitijela iz žumanjka, a metodom Western blota uspješno smo izdvojili IgY protutijela specifična za CA 15-3 marker.

Ovi rezultati se podudaraju s rezultatima nekolicine drugih istraživanja koja su ispitivala učinkovitost IgY protutijela u vezanju sa specifičnim antigenima. Primjerice, ZHEN i suradnici (2008.) su u svojem istraživanju ispitivali IgY protutijela i njihovu namjenu u terapiji mastitisa u goveda, izdvajajući protutijela SDS-PAGE elektroforezom, pri čemu su uspješno prilagodili IgY molekule da se vežu za antigene receptore bakterije *Staphylococcus aureus*. AKITA i NAKAI (1992.) su istu metodu koristili s velikim uspjehom u povezivanju imunoglobulina na antigene *E. coli*. NIKBAKHT i suradnici (2012.) su sličnim metodama uspješno stvorili IgY protutijela specifična za M2e protein influenze, a navode i korist Western blota u dijagnostičke svrhe.

Istraživanja nadalje potvrđuju korist i praktičnost IgY protutijela u terapeutici i dijagnostici u odnosu na IgG protutijela sisavaca. IgY protutijela se lakše i jeftinije nabavljaju, pristupačnija su u većim količinama, a zbog filogenetskih razlika između domaćina dolazi do minimalne interferencije s imunološkim sustavom sisavaca. To ih čini idealnima za detekciju markera poput CA 15-3, i mogu poslužiti u dijagnostičke svrhe za ranu detekciju tumora mliječne žlijezde. Sama primjena laboratorijske tehnike u ranoj je fazi razvoja zbog mnogih metoda izdvajanja IgY protutijela, no ističe se važnost primjene ELISA i mokrog prijenosa.

6. ZAKLJUČAK

Nakon imunizacije kokoši s antigenskim markerom CA 15-3, iz žumanjaka su izdvojena IgY antitijela metodom PEG precipitacije. Pritom smo usporedili dvije metode mjerenja proteina u uzorcima i zaključili da je metoda NanoDrop pouzdanija za izračun od metode Bradford. Starost jaja i datum njihova nesenja nije pokazao značajnog utjecaja na količinu antitijela u žumanjku, pošto su antitijela dosta stabilne molekule kada se drže na temperaturama frižidera i zamrzivača.

Izdvojena poliklonalna antitijela nisu podjednako reagirala na izlaganje danom antigenu, no određena specifičnost na antigen CA 15-3 ipak je uočljiva u određenih uzoraka, ponajviše na uzorku III. Kao što su ostala istraživanja potvrdila, moguće je povećati specifičnost antitijela i na taj ih način prilagoditi za korist u dijagnostici i monitoringu pacijenata. No, svakako su potrebna dodatna istraživanja, kako bi ovakva metoda mogla biti implementirana u praksi, te da bi se IgY protutijela mogla uspješno koristiti u dijagnostici tumora mliječna žlijezde u kuja.

7. SAŽETAK

Neoplazije u pasa uzrokuju preko 50% uginuća u dobi iznad 10 godina, a najčešća u ženki pasa je neoplazija mliječne žlijezde, koja se može javiti već u dobi od 4 godine. Osim benignih, lokaliziranih oblika ove bolesti, u čak 80% slučajeva može se javiti u malignom obliku s metastazama po organizmu. Mogućnost pravovremene terapije u slučaju neoplazije mliječne žlijezde danas pridonosi izlječenju ili značajnom produženju života oboljelog psa kao i boljim uvjetima života, pa je rana dijagnostika iznimno važna. Tumorski marker iz

seruma, CA 15-3, nedavno preuzet iz humane medicine gdje je korišten u dijagnostici raka dojke u žena, i u pasa se pokazao obečavajućim.

Cilj diplomskog rada je istražiti kvalitetu poliklonskih anti-CA 15-3 IgY antitijela iz kokošjih jaja i njihovu specifičnost za tumorski marker u serumu kuja.

Ključne riječi: IgY antitijela, karcinom mliječne žlijezde, CA 15-3 marker, PEG, elektroforeza, Western blot;

Characterisation of polyclonal IgY chicken egg antibodies for CA 15-3 protein and its specificity for homologous protein in bitch serum

8. SUMMARY

Neoplasia in dogs cause over 50% deaths at the age over 10 years, and the most common form in female dogs is the mammary gland tumor, which can appear as soon as at 4 years of age. Aside from benign, localised forms of this disease, a malignant, metastatic form may appear in as much as 80% of cases. Application of therapy at the right time in case of a mammary gland neoplasia contributes to the healing or the distinct increase of life expectancy of a diseased dog, as well as contributes to a finer conditions of life, therefore early diagnosis is of extreme importance. A serum-extracted tumor marker, CA 15-3, which has recently been adopted from the fields of human medicine, has been used in breast cancer diagnostics, and has shown great promise in dogs as well.

The aim of this research is to investigate the quality of policlonal anti-CA 15-3 IgY antibodies extracted out of chiken eggs, and their specificity for the tumor marker in female dog serum.

Key words: IgY antibodies, mammary gland carcinoma, CA 15-3 marker, PEG electrophoresis, Western blot;

9. POPIS LITERATURE

1. AKITA, E. M., S. NAKAI (1992.): Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. Journal of Immunological Methods. 160(2):207-14.
2. BALEN, B., M. KRSNIK-RASOL, D. PAVOKOVIĆ, P. PEHAREC ŠTEFANEC (2011.): Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Hvatska Sveučilišna Naklada, Zagreb.
3. DA SILVA , W. D., D. V. TAMBOURGI (2010.): IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. Veterinary Immunology and Immunopathology. 135(3-4):173-80.
4. DUFFY, M. J., D. EVOY, E. W. MCDERMOTT (2010.): CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. Clinica Chimica Acta. 1869-74.
5. GRYZWA, R., A. ŁUPICKA-SŁOWIK, M. WALCZAK, M. IDZI, K. BOBREK, S. BOIVIN, A. GAWEŁ, T. STEFANIAK, J. OLEKSYSZYN, M. SIEŃCZYK (2013.): Highly Sensitive Detection of Cancer Antigen 15-3 Using Novel Avian IgY Antibodies. ALTEX. 43-52.
6. HAJSIG, D., LJ. PINTER, R. ANTOLOVIĆ, J. MANDIĆ (2013.): Veterinarska imunologija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tisak.
7. KOVACS-NOLAN, J., Y. MINE (2004.): Avian egg antibodies: basic and potential applications. Avian and Poultry Biology Reviews, Volume 15. pp. 25-46(22).
8. LEDECKY, V., A. VALENCAKOVA-AGYAGOSOVA, J. LEPEJ, Z. FRISCHOVA, S. HORNAK, V. NAGY (2013.): Determination of carcinoembryonic antigen and cancer antigen values with the radioimmunoassay method in healthy females dogs. Veterinarni Medicina. 277–283.
9. MANUALI, E., A. DE GIUSEPPE, F. FELIZIANI, K. FORTI, C. CASCIARI, M. CHIARA MARCHESI, E. PACIFICO, K. M. PAWŁOWSKI, K. MAJCHRZAK, M. KRÓL (2012.): CA 15–3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. ,BMC Veterinary Research. 8:86.
10. MARCHESI, M.C., E. MANUALI, E. PACIFICO, C. FERRI, M. ROMAGNOLI, V. MANGILI, G. FRUGANTI (2010): Cancer antigen 15/3: possible diagnostic use in veterinary clinical oncology. Preliminary study. Veterinary Research Communications. 34 Suppl 1:S103-6.

11. NIKBAKHT, G., M. JAHNTIGH, F. ASSADIAN (2012.): Generation of Egg Yolk Antibodies in Chicken (*IgY*) Against Influenza M2 (M2e) Protein. International Conference on Chemical, Biological and Medical Sciences. Kuala Lumpur (Malaysia).
12. PAULY, D., P. A. CHACANA, E. G. CALZADO, B. BREMBS, R. SCHADE (2011.): IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. Journal of Visualized Experiments. pii: 3084.
13. SCHADE, R., H. R. TERZOLO (2006.): IgY-technology: application and trends. Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Dorotheenstr. 94, D-10117 Berlin, Germany. Instituto Nacional de Technologia Agropecuaria (INTA) EEA Balcarce, CC276, 7620 Balcarce, Argentina.
14. SPILLNER, E., I. BRAREN, K. GREUNKE, H. SEISMANN, S. BLANK, D. DU PLESSIS (2012.): Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization. 313-22.
15. SUN, H., S. CHEN, X. CAI, G. XU, L. QU (2013.): Correlation analysis of the total IgY level in hen serum, egg yolk and offspring serum. Journal of Animal Science and Biotechnology. 4(1): 10.
16. TAN, S. H., A. MOHAMEDALI, A. KAPUR, L. LUKJANENKO, M. S. BAKER (2012.): A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. Journal of Immunological Methods. 380(1-2):73-6.
17. ZHEN, Y. H., L. J. JIN, J. GUO, X. Y. LI, Z. LI, R. FANG, Y. P. XU (2008.): Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing Staphylococcus aureus. Journal of Applied Microbiology. 105(5):1529-35.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Novom Sadu u Srbiji, 7. svibnja 1990. godine. Zbog raznih napetih okolnosti, uključivši Domovinski rat, moja majka se zajedno sa mnom i mojom sestrom preselila u Zagreb 1991. godine, i u Hrvatskoj sam proveo većinu svog života. Pohađao sam Osnovnu školu Nikole Tesle u Zagrebu do trećeg razreda, a zbog selidbe u novi stan sam obrazovanje osnovne škole završio u Osnovnoj školi Ljubljanica. Potom sam pohađao opće znanje u Gornjogradskoj gimnaziji u Zagrebu, gdje sam maturirao 2009. godine, a iste sam godine i upisao preddiplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.

Studiranje nije bilo lagano, no kroz osnovnu i srednju školu ljudi su me uvjek hvalili na mojim uspjesima, te sam se isticao kao jedan od najboljih učenika u mojim razredima. Dolaskom na sveučilišnu razinu, isticanje je prešlo u prosječan uspjeh, jer je studij bio daleko zahtjevniji a moje iskustvo preoskudno. Moje su ocjene pale s odličnih na dobre. U početku sam tu promjenu primio s velikim šokom, ali ipak sam nastojao dati sve od sebe.

Tokom studija sam sudjelovao u nastavi kao demonstrator iz kolegija Zoologija na Zavodu za Biologiju, i to kroz sve godine nakon što sam kolegij položio s vrlo dobrim uspjehom na prvoj godini. Također sam se 2013. pridružio studentskoj udruzi Equus, pomagao pri organizaciji njihovih tombola i drugih događaja, a zajedno s njima sam aktivno sudjelovao u organiziranju i predstavljanju izložbe egzotičnih životinja pod imenom "Reptilomanija", a sljedeće godine i "Reptilomanija+". Kao rezultat sudjelovanja na tim izložbama, dodijeljena mi je posebna Rektorova nagrada za akademsku godinu 2014/2015 kao i ostalim sudionicima.

Na savjet doc. dr. sc. Željka Gottsteina, predstojnika Zavoda za bolesti peradi, 2014. godine počeo sam asistirati njegovom kolegi, doc. dr. sc. Dubravku Pavokoviću sa Zavoda za molekularnu biologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, na njegovom istraživanju koje je na posljetku postala osnova za ovaj diplomski rad. Rad u laboratoriju bilo je dragocijeno iskustvo koje ne želim zaboraviti. Isto vrijedi i za moj klinički rad u Veterinarskoj ambulanti u Španskom, gdje sam od travnja do lipnja 2016. godine proveo kao volonter pod mentorstvom doktorice Gordane Makar.

I sada, 2016. godine, pripremam se za posljednje faze svog studija, s prosječnom ocjenom od 3.98. Sljedeći korak u mom životu, iskreno, potpuno mi je nepoznat.