

Surowicze stężenie cystatyny C i aktywność antytrypsynowa w chorobach zakaźnych kur

KRZYSZTOF GOŁĄB, ANDRZEJ GAWEŁ*, MARIA WARWAS, MICHAŁ MAZURKIEWICZ*

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego AM, ul. Szewska 38/39, 50-139 Wrocław

*Katedra Epizootiologii i Administracji Weterynaryjnej z Kliniką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Gołąb K., Gaweł A., Warwas M., Mazurkiewicz M.

Serum concentration of cystatin and antitrypsin activity in chicken infection diseases

Summary

The aim of the study was to determine the influence of some pathogens on the serum level and dynamics of chicken cystatin and $\alpha 1$ -protease inhibitor. The experiment was carried out on 150 Starbro chickens that were randomly selected into 6 groups. Group I was the control, group II and III were infected with REO virus and Marek's disease virus, group IV with invasive *Eimeria* oocysts, and V and VI with *E. coli* and *S. aureus* respectively. The level of chicken cystatin was determined by ELISA test and $\alpha 1$ -protease inhibitor as an antitrypsin capacity. It was demonstrated that the concentration of chicken cystatin increased in chickens with the virus infection REO and MDV by about 54% and 29%, while with *E. coli* and *S. aureus* by 43%. The smallest changes, observed in chickens infected with *Eimeria* oocyst, amounted to 16%. In contrast, the authors only observed an increase of the level $\alpha 1$ -protease inhibitor in coccidiosis. The authors postulate that chicken cystatin is more useful as a diagnostic parameter than $\alpha 1$ -protease inhibitor in the analysed diseases.

Keywords: chicken, cystatin, antitrypsin

Mikroorganizmy – bakterie, wirusy i pierwotniaki są przyczyną wielu chorób u drobiu. Do częstszych należą: kolibakterioza, stafylokokoza, choroba Mareka, reowiroza oraz kokcydioza. Prowadzą one do uszkodzeń narządów wewnętrznych, obniżając poziom produkcji i podwyższając jej koszty (5, 26). Określenie możliwości uzyskania wolnych od zakażenia ptaków oraz objęcie ich programem nadzoru i profilaktyki jest szczególnie ważne w dobie intensyfikacji produkcji zwierzęcej. Jedną z metod wspomnianego programu mogłyby być oznaczenia parametrów biochemicznych surowicy krwi. Testy biochemiczne użyte w monitorowaniu przebiegu choroby umożliwiłyby również ocenę skuteczności stosowania nowych leków. Wzorując się na badaniach u ludzi, można wziąć pod uwagę chociażby białka ostrej fazy, które pojawiają się w organizmie na skutek uszkodzeń tkanek, stanu zapalnego czy zakażeń (14). Jedną z pierwszych prac (1995 r.), w której zaproponowano takie podejście u kur było oznaczanie białek ostrej fazy w przebiegu eksperymentalnie wywołanego stanu zapalnego (21). Niestety, jak dotąd mechanizmy oraz poszczególne białka biorące udział w odpowiedzi ostrej fazy u ptaków nie zostały jeszcze dobrze poznane. Wiadomo, że podczas stanów zapalnych u kur dochodzi do wzrostu stężeń takich białek, jak: kwaśna α_1 -glikoproteina (10), transferyna (25), fibronektyna (1) i surowiczego

amyloidu A (4) oraz spadku tzw. negatywnych białek ostrej fazy: albumin (9). Opis wybranych białek ostrej fazy u ptaków podano w opracowaniach przeglądowych (12, 14).

Celem badań było określenie przydatności diagnostycznej oznaczania surowiczego stężenia cystatyny (inhibitora proteaz cysteinowych), uznanego markera filtracji kłębuszkowej nerek u ludzi w przebiegu kilku wybranych chorób u kur, takich jak: kolibakterioza, stafylokokoza, choroba Mareka, reowiroza oraz kokcydioza. Uzyskane wyniki porównywano z aktywnością (pojemnością) antytrypsynową, pochodzącą w 90% od α_1 -inhibitora proteaz (α_1 -IP, dawniej nazywanego α_1 -antytrypsyną), inhibitora proteaz serynowych należącego do grupy białek ostrej fazy.

Materiały i metody

Badaniami objęto stado brojlerów Starbro liczące 150 sztuk, które podzielono na 6 grup. Grupę I, kontrolną, stanowiły ptaki zdrowe. Grupę II tworzyły ptaki zakażone w 1. dobie eksperymentu wirusem Reo, a grupę III wirusem choroby Mareka (MDV). W 10 dobie trwania eksperymentu zarażono IV grupę kulturą inwazyjnych oocyst kokcydiów *E. tenella* w dawce $1,5 \times 10^4$, wyizolowanych z terenowego przypadku kokcydiozy. W 14. dobie zakażono grupę V bakteriami *Staphylococcus aureus* w dawce $1 \text{ ml} \times 10^7$ jtk oraz grupę VI – *Escherichia coli* w dawce

1 ml \times 10⁷ jtk. Wszystkie ptaki poza grupą czwartą uodporniono przeciwko kokcydiozie w 5. dniu odchowu przy użyciu szczepionki Livacox T. Co tydzień, przez okres 6 tygodni, pobierano krew i uzyskane surowice przechowywano zamrożone w temperaturze -80°C , do chwili wykonania oznaczeń.

W badanych surowicach oznaczono stężenie kurzej cystatyny testem ELISA (7). Jako przeciwciał opłaszczających użyto kozich przeciwciał skierowanych przeciwko kurzej cystatinie, o stężeniu 3 $\mu\text{g/ml}$ w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS). Nanoszono po 100 μl do studzienki i inkubowano 2 godz. w temp. 37°C . Po tym czasie zawartość studzienek wylewano przez energiczne wytrząsanie, a nadmiar niezwiązanych przeciwciał odpłukiwano, nanosząc po 250 μl 0,05% roztworu Tween 20 (firmy Sigma Chemical) w PBS (PBS-T), 1 raz szybko i 4 razy wolno, zachowując 5-minutowe odstępy między kolejnymi płukaniem. Wolne miejsca wiążące blokowano, nanosząc po 250 μl 1% roztworu albuminy wołowej (BSA – otrzymanej w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej AM we Wrocławiu) w 0,05% roztworze Tween 20 PBS (PBS-T-BSA) przez 2 godz. w temp. 37°C i następnie całą noc w 4°C . Nadmiar BSA odpłukiwano tak, jak opisano powyżej. Kolejnym etapem było nanoszenie standardów cystatyny i badanych próbek rozcieńczonych w PBS-T w objętości 100 μl na studzienkę i 1-godz. inkubacja w temp. 37°C . Nadmiar niezwiązanych reagentów odpłukiwano jak wyżej. Ostatnim elementem kanapki było nanoszenie koniugatu o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ w roztworze PBS-T-BSA. Nanoszono go po 100 μl i inkubowano przez 1 godz. w temp. 37°C . Nadmiar koniugatu odpłukiwano jak wyżej. Aktywność peroksydazową oznaczano, inkubując przez 30 min., w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła, z 200 μl roztworu zawierającego: 50 mg o-fenylendwuaminy (firmy Sigma Chemical) rozpuszczonej w 100 ml 0,05 M buforu cytrynianowo-fosforanowego o pH 5,0 i aktywowanego 10 μl H_2O_2 . Reakcję przerywano przez dodanie 50 μl 3 M kwasu solnego. Absorbancję próbek odczytywano przy długości fali $\lambda = 492 \text{ nm}$ i filtry referencyjnym $\lambda = 630 \text{ nm}$.

W badanych próbkach surowicy oznaczono także białko całkowite metodą Bradford (3) oraz aktywność antytrypsynową α_1 -inhibitora proteaz wg Schöna i wsp. (18), wykorzystując jako substrat N- α -benzoilo-DL-arginylo- β -nafityloamid (firmy Sigma Chemical), której jednostką (J) jest 1 g zahamowanej trypsyny przez 1 L surowicy.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica PL StatSoft-Polska, z zastosowaniem testu analizy wariancji ANOVA. Za statystycznie istotne uznano różnice przy $p \leq 0,05$.

Wyniki i omówienie

Ptaki zakażone wirusem Reo oraz MDV cechowały się apatią, osowiałością oraz zmniejszonym łaknięciem. Po kilku dniach odnotowano padnięcia, kulawizny i obrzęki stawów skokowych. Obraz kliniczny obserwowany po zakażeniu był typowy dla użytego patogenu.

Z oznaczonych w surowicy krwi parametrów: stężenia cystatyny, pojemności antytrypsynowej oraz stę-

żenia białka całkowitego nie wykazano istotnych różnic między grupami jedynie dla białka całkowitego. Uzyskane dla niego wartości mieściły się w przedziale stężeń 28,0-32,0 g/L.

Poziom cystatyny w surowicy krwi ptaków oraz aktywność α_1 -IP zestawiono w tab. 1 i 2. Poziom cystatyny u ptaków grupy kontrolnej był statystycznie istotnie podwyższony w 6. tygodniu odchowu. Najmniejsze zmiany w stężeniu cystatyny wykazano u ptaków zarażonych inwazyjnymi oocystami kokcydii. W 2. tygodniu wzrosło ono około 16% w stosunku do grupy kontrolnej i utrzymywało się na zbliżonym poziomie do końca trwania eksperymentu (tab. 1). Po zakażeniu wirusami, a szczególnie wirusem Reo, odnotowano znacznie większy wzrost stężenia cystatyny. U kurcząt zakażonych wirusem Reo wzrost utrzymywał się od 1. do 5. tygodnia w stosunku do kontroli, osiągając najwyższą wartość w 4. tygodniu (dzień 28., $8,62 \pm 2,36 \text{ mg/L}$, $p < 0,001$). Z kolei po zakażeniu wirusem choroby Mareka obserwowano istotny wzrost stężenia cystatyny w 3. i 4. tygodniu, odpowiednio $7,24 \pm 1,24 \text{ mg/L}$ ($p < 0,05$) i $7,23 \pm 1,63 \text{ mg/L}$ ($p < 0,01$) oraz nieistotny spadek w 35. dniu.

W grupach kurcząt zakażonych *E. coli* i *S. aureus* stężenie cystatyny w surowicy było podwyższone przez cały okres trwania obserwacji (od 10% do 40%), osiągając najwyższą wartość w 21. dniu po zakażeniu *E. coli* ($8,57 \pm 1,83 \text{ mg/L}$, $p < 0,05$) i 28. dniu po zakażeniu *S. aureus* ($8,9 \pm 2,1 \text{ mg/L}$).

Kurza cystatyna, podobnie jak ludzka cystatyna C są małymi białkami należącymi do rodziny 2 superrodziny cystatyn lub rodziny IC25 (wg nowej klasyfikacji zmieszczonej w bazie danych MEROPS <http://merops.sanger.ac.uk>). Hamują one endo- i egzogenne proteazy cysteinowe (bakteryjne, wirusowe), wykazują aktywność antywirusową i antybakteryjną oraz modulują układ immunologiczny. Ludzka cystatyna C uczestniczy w patomechanizmie chorób nowotworowych, stanów zapalnych, chorób neurodegeneracyjnych i innych (16).

Pomimo iż pierwszą wyizolowaną cystatyną była cystatyna białka jaja kurzego, to w piśmiennictwie nie ma prac odnoszących się do jej stężenia w surowicy krwi chorych kur. Wiadomo jedynie, że występuje w surowicy kurcząt obu płci, a jej stężenie oznaczone metodą immunodiffuzji radialnej to około 1 mg/L (2). Stężenie cystatyny w białku jaja zmienia się podczas embriogenezy (7), a także zależy od wieku niosek (22). Szczegółowe właściwości kurzej cystatyny opisane zostały przez Gołębia i wsp. (8), zaś właściwości przeciwbakteryjne w publikacji Wesierskiej i wsp. (24).

Przez analogię do ludzkiej cystatyny C można przypuszczać, że wykazane w naszych badaniach zmiany surowiczego stężenia cystatyny u zakażonych kurcząt mogą być wynikiem zaburzenia filtracji kłębuszkowej nerek (GRF). U osób zdrowych stężenie cystatyny C utrzymuje się na stałym poziomie i jest niezależne od płci, masy mięśniowej i przewlekłych stanów zapal-

Tab. 1. Stężenie kurzej cystatyny C (mg/L) w surowicy krwi i zmiany (%) w stosunku do kontroli (n = 20; $\bar{x} \pm s$)

Pobrania krwi (dni)	Grupa ptaków											
	I Kontrola	II Zakażenie wirusem Reo	%	III Zakażenie MDV	%	IV Zarażenie kokcydiami	%	V Zakażenie <i>E. coli</i>	%	VI Zakażenie <i>S. aureus</i>	%	
I (7)	6,00 ± 1,19	6,72 ± 1,58	↑12	6,47 ± 1,21	↑8							
II (14)	6,13 ± 1,03	7,42 ± 1,94	↑21	6,35 ± 1,34	↑4	6,13 ± 1,33	0					
III (21)	6,08 ± 0,81	8,02 ± 1,87**	↑32	7,24 ± 1,24*	↑19	7,03 ± 1,36	↑16	6,70 ± 0,93	↑10	6,94 ± 1,63	↑14	
IV (28)	5,61 ± 1,14	8,62 ± 2,36***	↑54	7,23 ± 1,63**	↑29	5,72 ± 1,22	↑2	8,04 ± 1,27***	↑43	8,00 ± 2,58**	↑43	
V (35)	6,90 ± 1,93	7,98 ± 1,43	↑16	6,41 ± 1,18	7	7,28 ± 1,71	↑5	8,57 ± 1,83*	↑24	8,63 ± 2,35	↑25	
VI (42)	7,64 ± 1,97	6,71 ± 1,15	12	7,02 ± 1,27	8	7,41 ± 1,34	3	6,87 ± 1,03	10	8,91 ± 2,11	↑17	

Objaśnienia: różnice statystycznie istotne przy * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$; ↑ – wzrost w stosunku do kontroli

Tab. 2. Aktywność α_1 -inhibitora proteaz (J/L) w surowicy krwi i zmiany (%) w stosunku do kontroli (n = 15; $\bar{x} \pm s$)

Pobrania krwi (dni)	Grupa ptaków											
	I Kontrola	II Zakażenie wirusem Reo	%	III Zakażenie MDV	%	IV Zarażenie kokcydiami	%	V Zakażenie <i>E. coli</i>	%	VI Zakażenie <i>S. aureus</i>	%	
I (7)	1,39 ± 0,24	1,17 ± 0,21	16	0,78 ± 0,41***	44							
II (14)	1,26 ± 0,13	0,85 ± 0,20***	32	0,96 ± 0,32*	24	1,09 ± 0,26***	14					
III (21)	1,24 ± 0,21	0,80 ± 0,20***	35	1,24 ± 0,21	0	2,46 ± 0,31***	↑99	0,95 ± 0,19**	23	1,01 ± 0,48	18	
IV (28)	1,07 ± 0,25	1,35 ± 0,29*	↑26	0,99 ± 0,35	8	1,72 ± 0,40	↑60	0,90 ± 0,10	16	2,94 ± 0,83***	↑175	
V (35)	1,40 ± 0,26	0,91 ± 0,15***	35	1,15 ± 0,46	18	1,45 ± 0,21***	↑4	0,87 ± 0,21***	38	1,29 ± 0,38	8	
VI (42)	1,14 ± 0,17	1,26 ± 0,20	↑10	1,14 ± 0,26	0	2,53 ± 0,63	↑122	0,75 ± 0,26***	34	0,50 ± 0,29**	56	

Objaśnienia: jak w tab. 1.

nych. W chorobach przebiegających nawet z łagodnym spadkiem GFR obserwuje się wzrost stężenia cystatyny C. Wzrost jej stężenia w surowicy zaobserwowano także w chorobach tarczycy, chorobie nowotworowej (czerniak, rak jelita grubego i płuc), AIDS oraz podczas leczenia glikokortykosteroidami lub cyklosporynami (16).

W przebiegu zakażenia kurcząt użytymi w eksperymencie patogenami dochodzi, między innymi, do uszkodzenia wątroby i przewodu pokarmowego, co mogło przyczynić się do wzrostu stężenia cystatyny w surowicy (15). Uważa się, że wzrost stężenia cystatyny u chorych na nowotwory i marskość wątroby, korelujący ze stopniem jej zwłóknienia, związany jest z nieznacznym obniżeniem GFR (6). Ponadto w przebiegu eksperymentalnego zakażenia u kurcząt mogło dojść do zaburzenia równowagi enzym/inhibitor przez enzymy pochodzenia bakteryjnego. Wiadomo, że bakterie *S. aureus* produkują proteazy cysteinowe, które umożliwiają ich rozwój (20), oraz że cystatyna α hamuje ich wzrost (19). Nie można więc wykluczyć, że zwiększenie stężenia cystatyny jest w jakiejś mierze odpowiedzią organizmu na pojawienie się większej ilości proteaz cysteinowych syntetyzowanych przez mikroorganizmy. Ponadto, cystatyny wszystkich rodzin, w tym kurza cystatyna, indukują syntezę NO przez makrofagi otrzewnowe aktywowane γ -interferonem (23), którego synteza może mieć znaczenie

w odpowiedzi immunologicznej wywołanej przez wyżej wymienione choroby.

Syntetyzowany głównie w wątrobie α_1 -inhibitor proteaz jest jednym z najsilniejszych inhibitorów proteaz serynowych (serpin). Należy do białek ostrej fazy również u kur (14). Jego podstawowa funkcja to modulowanie aktywności elastazy, uwalnianej z granulocytów wielojądrowych (11). Chroni tkanki przed proteazami leukocytów, makrofagów i bakterii oraz proteazami lizosomalnymi uwalnianymi w wyniku urazu. Jego niedobór prowadzi do niekontrolowanej aktywności elastynolitycznej, co stwarza szczególne zagrożenie dla tkanki płucnej (17).

W niniejszych badaniach oznaczano aktywność (pojemność) antytrypsynową, która jest miernikiem funkcji biologicznej inhibitora, ale nie idzie w parze ze stężeniem oznaczanym metodą immunologiczną. Wiadomo bowiem, że pewne stany patologiczne, takie jak: nowotwory, choroby nerek i wątroby oraz cukrzyca prowadzą do obniżenia aktywności właściwej (13). Największe zmiany w aktywności α_1 -IP wykazano dla kokcydiozy (tab. 2). W 2. tygodniu trwania choroby aktywność wzrosła około 2-krotnie w stosunku do grupy kontrolnej. Po zakażeniu rewirusem odnotowano spadek pojemności antytrypsynowej w stosunku do kontroli, który utrzymywał się od 2. do 5. tygodnia. Natomiast u kurcząt zakażonych wirusem choroby Mareka wystąpiło jedynie niewielkie obniżenie aktyw-

ności α_1 -IP w 2. tygodniu. Po zakażeniu *E. coli* obniżona aktywność α_1 -IP w surowicy krwi utrzymywała się przez cały okres obserwacji kurcząt, osiągając najniższą wartość w 28. dniu. Z kolei po zakażeniu *S. aureus* najwyższą aktywność antytrypsynową wykazano w 14. dniu choroby.

Widoczne w przebiegu eksperymentu wahania aktywności α_1 -IP są trudne do interpretacji. Mogą one być odzwierciedleniem dynamiki procesu chorobowego. Pojawienie się zwiększonej ilości proteaz w układzie krążenia prowadzi do tworzenia kompleksów z inhibitorem, które są szybko usuwane. Obniżona aktywność specyficzna α_1 -IP może też wynikać z jego zużycia, gdyż uszkodzona wątroba nie nadąża z biosyntezą, jak też stresu oksydacyjnego wywołanego chorobą (17).

Reasumując można stwierdzić, że większą przydatność w monitorowaniu przebiegu chorób zakaźnych u kur posiada oznaczenie cystatyny niż aktywności α_1 -IP. Wzrost stężenia cystatyny obserwuje się po zakażeniu bakteriami (*E. coli* i *S. aureus*) (43%) i wirusami (wirusem Reo 54% oraz wirusem choroby Mareka 29%), a najniższy po zarażeniu oocystami kokcydiów. Dokładne określenie, który z narządów jest odpowiedzialny za wzrost stężenia cystatyny w surowicy, wymaga pogłębionych badań z oznaczeniem kilku różnych parametrów biochemicznych i włączeniem oceny histochemicznej.

Piśmiennictwo

1. Amrani D. L., Mauzy-Melitz D., Mosesson M. W.: Effect of hepatocyte-stimulating factor and glucocorticoids on plasma fibronectin levels. *Biochem. J.* 1986, 238, 365-371.
2. Anastasi A., Brown M. A., Kembhavi A. A., Nicklin M. J., Sayers C. A., Sunter D. C., Barrett A. J.: Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. *Biochem. J.* 1983, 211, 129-138.
3. Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
4. Chamanza R., Toussaint M. J., van Ederen A. M., van Veen L., Hulskamp-Koch C., Fabri T. H.: Serum amyloid A and transferrin in chicken. A preliminary investigation of using acute-phase variables to assess diseases in chickens. *Vet. Q.* 1999, 21, 158-162.
5. Gawel A., Mazurkiewicz M., Jurowski J.: Efektywność szczepionki Immucox w zapobieganiu kokcydiozie kur. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 548-552.
6. Gerbes A. L., Gulberg V., Bilzer M., Vogeser M.: Evaluation of serum cystatin C concentration as a marker of renal function in patients with cirrhosis of the liver. *Gut* 2002, 50, 106-110.
7. Gołąb K., Gburek J., Gawel A., Warwas M.: Changes in chicken egg white cystatin concentration and isoforms during embryogenesis. *Brit. Poultry Sci.* 2001, 42, 394-398.
8. Gołąb K., Warwas M.: Białka jaja kurzego – właściwości biochemiczne i zastosowania. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2005, 14, 1001-1010.
9. Grieninger G., Liang T. J., Beuving G., Goldfarb V., Metcfe S., Muller-Eberhard U.: Hemopexin is developmentally regulated, acute-phase plasma protein in chicken. *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 15719-15724.
10. Holt P. S., Gast R. K.: Comparison of the effects of infection with *Salmonella enteritidis*, in combination with an induced molt, on serum levels of the acute phase protein, alpha1 acid glycoprotein, in hens. *Poult. Sci.* 2002, 81, 1295-300.
11. Karnaukhova E., Ophir Y., Golding B.: Recombinant human alpha-1 proteinase inhibitor: towards therapeutic use. *Amino Acids* 2006, 30, 317-332.
12. Kostro K., Wojcicka-Lorenowicz K., Gliński Z., Krakowski L., Wrona Z.: Białka ostrej fazy jako ligandy komórek układu immunologicznego. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 929-933.
13. Lisowska-Myjak B., Pachecka J.: Antigenic and functional levels of alpha-1-antitrypsin in serum during normal and diabetic pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2003, 106, 31-35.

14. Mazur-Gonkowska B., Koncicki A.: Białka ostrej fazy u ptaków – występowanie i charakterystyka. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 925-928.
15. Mazurkiewicz M.: Choroby drobiu. WAR, Wrocław 2005, 186-425.
16. Mussap M., Plebani M.: Biochemistry and clinical role of human cystatin C. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2004, 41, 467-550.
17. Pafrey H., Mahadeva R., Lomas D. A.: α_1 -antitrypsin deficiency, liver disease and emphysema. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003, 35, 1009-1014.
18. Schön H., Råster B.: Untersuchungen über die Trypsininhibitor Kapazität des menschlichen Serums. *Clin. Chim. Acta* 1962, 7, 571-587.
19. Takahashi M., Tezuka T., Korant B., Katumuma N.: Inhibition of cysteine protease and growth of *Staphylococcus aureus* V8 and poliovirus by phosphorylated cystatin alpha conjugate of skin. *Biofactors* 1999, 10, 339-345.
20. Takeuchi S., Kinoshita T., Kaidoh T., Hashizume N.: Purification and characterization of protease produced by *Staphylococcus aureus* isolated from a diseased chicken. *Vet. Microbiol.* 1999, 67, 195-202.
21. Tohjo H., Miyoshi F., Uchida E., Niyama M., Syuto B., Moritsu Y., Ichikawa S., Takeuchi M.: Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of chicken serum in acute inflammation induced by intramuscular injection of turpentine. *Poult. Sci.* 1995, 74, 648-655.
22. Trziszka T., Saleh Y., Kopeć W., Siewiński M., Wesierska E.: Effect of hen's age on the level of cystatin in the chicken egg white. *Int. J. Poultry Sci.* 2004, 3, 471-477.
23. Verdout L., Lalmanach G., Vercruyse V., Hoebeke J., Gauthier F., Vray B.: Chicken cystatin stimulates nitric oxide release from interferon-gamma-activated mouse peritoneal macrophages via cytokine synthesis. *Eur. J. Biochem.* 1999, 266, 1111-1117.
24. Wesierska E., Saleh Y., Trziszka T., Kopeć W., Siewiński M., Korzekwa K.: Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 21, 59-64.
25. Xie H., Newberry L., Clark F. D., Huff W. E., Huff G. R., Balog J. M., Rath N. C.: Changes in serum ovotransferrin levels in chickens with experimentally induced inflammation and diseases. *Avian Dis.* 2002, 46, 122-131.
26. Yun C. H., Lillehoj H. S., Lillehoj E. P.: Intestinal immune responses to coccidiosis. *Develop. Comp. Immunol.* 2000, 24, 303-324.

Adres autora: dr Krzysztof Gołąb, ul. Szewska 38/39, 50-139 Wrocław;
e-mail: golab@biofarm.am.wroc.pl