



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI



**BRUSELLOZLU HASTALARDA
EKSOZOM PROFİLİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

ABDURRAHMAN ŞİMŞEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURSA-2021

Abdurrahman ŞİMŞEK

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI



**BRUSELLOZLU HASTALARDA
EKSOZOM PROFİLİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

ABDURRAHMAN ŞİMŞEK

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DANIŞMAN:
Prof. Dr. Ferah BUDAK**

BURSA-2021

**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “**Brusellozlu Hastalarda Eksozom Profilinin Değerlendirilmesi**” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Abdurrahman ŞİMŞEK
Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

22/06/2021

Adı Soyadı: Abdurrahman Şimşek

Anabilim Dalı: Tıp-İmmünoloji

Tez Konusu: Brusellozlu Hastalarda Eksozom Profilinin Değerlendirilmesi

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Ferah Budak

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI.....	II
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU.....	III
TÜRKÇE ÖZET	VI
İNGİLİZCE ÖZET.....	VII
1-GİRİŞ.....	1
2-GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. <i>Brucella</i> Türlerinin Genel Özellikleri.....	6
2.2. Brusellozun Tarihçesi	8
2.3. Bruselloz Epidemiyolojisi.....	10
2.4. Bulaşma.....	12
2.5. Klinik Bulgular	13
2.6. Patogenez	15
2.7. Tanı Yöntemleri	18
2.8. Tedavi.....	21
2.9 Brusellozda Konak İmmün Yanıtı	22
2.9.1. Doğal İmmün Yanıt	23
2.9.2. Edinsel İmmün Yanıt	25
2.10. Eksozomlar.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Hastaların Seçimi ve Çalışma Planı	30
3.2. Eksozom İzolasyonu	31
3.3. Monoklonal CD9 Antikoru ile Karboksilateks Boncuk Konjugasyonu	32
3.4. İzole Edilen Eksozom Miktarlarının Belirlenmesi.....	33
3.5. Eksozom ve anti-CD9 Kaplı Karboksilateks Boncuk Konjugasyonu	35
3.6. Eksozom Varlığının Doğrulanması.....	36
3.6.1. Akan Hücre Ölçer ile Eksozom Varlığının Doğrulanması	36
3.6.2. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Eksozom Varlığının Doğrulanması	37
3.7. Akan Hücre Ölçer Değerlendirmesi.....	37
3.8. İstatiksel Değerlendirme	40
4-BULGULAR.....	41
4.1. Eksozom Varlığının Doğrulanması.....	42
4.2. Akan Hücre Ölçer Değerlendirmeleri	44
4.3. Hücre Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	48

5- TARTIŞMA VE SONUÇ	53
6- KAYNAKLAR	63
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	81
8. TEŞEKKÜR.....	83
9. ÖZGEÇMİŞ	84

TÜRKÇE ÖZET

Bruselloz, etkeni *Brucella* bakterileri olan dünya çapında zoonotik bir enfeksiyondur. Eksozomlar, birçok hücre tipi tarafından salınan multiveziküler gövdelerden türetilen küçük lipit veziküllerdir. Eksozomal hücre kargosu, kökenlendiği hücrenin tipini yansıtır. Bu çalışmada akut, kronik bruselloz ve sağlıklı kontrollerden alınan serum örneklerinden elde edilen eksozomların Akan Hücre Ölçer (AHÖ) yardımıyla immünofenotiplenmesini yapmak, farklı gruplarda eksozomların hangi hücre gruplarından köken aldığını belirlemek, brusellozun kronikleşmesinde, eksozomların etkisini ortaya koymak ve bruselloz immünopatogenezinde eksozomların potansiyel rollerine dair literatüre katkılar sunmak amaçlanmıştır.

Çalışmamıza, bruselloz tanısı konmuş 10 akut ve 10 kronik hasta ile 10 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Serum örneklerinden eksozomlar ticari izolasyon kiti kullanılarak elde edilmiştir. Önceden tasarlanan panelde, monoklonal antikorlarla boyandıktan sonra, AHÖ 'de eksozomların immünofenotiplenmesi yapılmıştır.

Eksozom varlığının doğrulanması, eksozoma spesifik monoklonal antikorlar olan CD9, CD63 ve CD81 boyamaları ve elektron mikroskobu (SEM) değerlendirmeleriyle yapılmıştır. Değerlendirme sonucuna göre granülosit kökenli eksozom değerleri akut grupta, kronik ve sağlıklı gruba göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır, bunun yanında kronik ve sağlıklı grup arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. G-MDSC (granülositik-myeloid kökenli süpressör hücreler) kökenli eksozom değerleri, akut grupta kronik ve sağlıklı gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur, aynı zamanda kronik grup ve sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı derecede farklılık gözlenmiştir.

Tez çalışması sonucunda, akut dönemde hastalığın patogenezinde granülosit kökenli eksozomların rol oynadığı ve ortamda bulunan myeloid kökenli süpressör hücrelerden kaynaklanan eksozomlarında granülosit kökenli eksozomlar olduğu bulunmuştur. Brusellozun farklı evrelerinde, granülosit kökenli ve G-MDSC kökenli eksozomlar arasındaki anlamlı farklar, hastalığın immünopatolojisine, yeni çalışmalarla birlikte önemli katkılar sunabilir.

Anahtar Kelimeler: bruselloz, eksozom, kronik, akut, ekstrasellüler veziküller

İNGİLİZCE ÖZET

Analysis of Exosome Profile in Patients with Brucellosis

Brucellosis is a worldwide zoonotic infection caused by a type of bacteria from the genus *Brucella*. Exosomes are small lipid vesicles derived from multi-vesicular bodies released by many cell types. The exosomal cell cargo reflects the type of cell from which it originated. In this study, we aimed to perform immunophenotyping of exosomes isolated from serum samples from acute, chronic brucellosis and healthy controls using Flow Cytometry, determine from which cell groups exosomes originate in different groups, reveal the effect of exosomes in the chronicity of brucellosis, and contribute to the literature on the potential roles of exosomes in the immunopathogenesis of brucellosis.

Our study included 10 acute and 10 chronic patients diagnosed with brucellosis and 10 healthy controls. Exosomes from serum samples were extracted using a commercial isolation kit. In the pre-designated panel, after staining with monoclonal antibodies (mAbs), the exosomes were immunophenotyped using Flow Cytometry.

Confirmation of the presence of exosome was performed by staining of exosome-specific mAbs CD9, CD63 and CD81 and electron microscopy (SEM) evaluations. According to the results of the evaluation, granulocyte and G-MDSC (granulocyte-like myeloid derived suppressor cells) derived exosomes (%) were significantly higher in the acute group compared to the chronic and healthy groups. On the other hand, a significant difference was observed between the chronic group and the healthy control in exosome values (%) originating from G-MDSC.

In this study, we found that granulocyte and G-MDSC-derived exosomes may play a role in the acute phase responses of brucellosis. The significant differences between granulocyte and G-MDSC-derived exosomes at different phases of brucellosis may contribute to the immunopathology of the disease with new studies.

Keywords: brucellosis, exosome, chronic, acute, extracellular vesicles

1-GİRİŞ

Bruselloz, insanlarda yüksek derecede morbiditeye sahip, bazı gelişmekte olan ülkelerde endemik olarak kabul edilen, dünya çapında zoonotik bir hastalıktır (Dean, Crump, Greter, Schelling, & Zinsstag, 2012). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, her yıl dünyada bu hastalığın yaklaşık 500.000 yeni vakası kayıtlara geçmektedir (Corbel, 1997). Bruselloz, Akdeniz, Orta Doğu, Afrika, Latin Amerika ve Asya'nın bazı bölgeleri gibi endemik olarak yüksek bulunan bölgelerde kontrol edilemeyen bir sorun olmaya devam etmektedir. Hastalık dünyanın hemen hemen her bölgesinde bildirilmiştir (Dean ve ark., 2012; Pappas, Papadimitriou, Akritidis, Christou, & Tsianos, 2006). Bruselloz, Türkiye'nin de yer aldığı Akdeniz Havzası bölgesinde hiper-endemik olarak kabul edilmektedir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK) 2017 yılı Bruselloz İstatistik Verileri raporuna göre vaka sayısı 6457 olarak bildirilmiştir. Aynı rapora göre, 2017 yılı itibariyle morbidite hızı da 100.000'de 7,99 olarak güncellenerek, bu oranda bir önceki yıla göre artış gözlenmiştir. THSK verilerine göre Türkiye'deki son ölümlü vaka ise 2008 yılında gözlenmiştir. Bruselloz, ülkemizde resmî kurumlara bildirilmesi zorunlu hastalıklardan birisidir. Ancak bildirilen rakamların, gerçek vaka sayılarının altında olduğu düşünülmektedir (THSK, 2017).

Bruselloz, temel olarak sığır, koyun, keçi, domuz ve develerden kan, plasenta, fetüs veya rahim salgıları ile doğrudan temas yoluyla veya pastörize edilmemiş süt veya yumuşak peynir gibi kontamine çiğ hayvansal ürünlerin tüketimi yoluyla bulaşır. Ayrıca bruselloz, dünya çapında laboratuvar kaynaklı en yaygın bakteri enfeksiyonlarından biridir. Halsizlik, iştahsızlık, ateş ve derin kas güçsüzlüğü ile karakterize olan bir hastalık olarak, 1860 yılında Marston tarafından tanımlandı. Sorumlu mikroorganizma, 1887'de David Bruce tarafından izole edildi. Hastalığın ilk izole edilmesinden günümüze kadar, yeni türler belirlendi (Gorvel, 2014). Günümüzde, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedia*, *B. microti*, *B. papionis*, *B. vulpis* ve *B. inopinata* da dahil olmak üzere bilinen 12 *Brucella* türü vardır. Bruselloz, birincil olarak, birden çok klinik belirti ve semptomla birlikte, kaynağı bilinmeyen ateş olarak ortaya çıkar. Hastalarda

spondilit, nörobruselloz veya *Brucella* endokarditi gibi ciddi fokal komplikasyonlar görülür. İnsan brusellozunun klinik özellikleri ve seyri, tifo ateşi, romatizmal ateş, spinal tüberküloz, piyelit, kolesistit, tromboflebit, otoimmün hastalıklar ve tümörler gibi diğer birçok enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan hastalıklarla örtüşmektedir (Colmenero ve ark., 1996; Lulu ve ark., 1988).

İlk kez 1980'li yılların sonunda, ekstrasellüler boşlukta keşfedilen eksozomlar, birçok hücre tipi tarafından hücre dışı ortama salgılanabilen hücre dışı veziküllerin bir alt grubu olan 40-100 nm çapında membran vezikülleridir (Tung, Ernstoff, Allen, & Shu, 2019). Hücrelerden salgılanan eksozomların başlangıçta, komşu hücreler üzerine etkisi olmayan, hücre hasarından kaynaklanan hücre atık veya hücre homeostazının yan ürünleri olduğu düşünülmüştür. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar, bu hücre dışı veziküllerin, lipid, protein, nükleik asit kargosu taşıyabilen işlevsel araçlar olduklarını göstermiştir. Eksozomların bu kargoları hedef hücrelere ulaştırabilme yeteneği, salınımından uzak yerdeki alıcı hücrelerin yeniden programlanabilmesi fikrini doğurmuştur (Zhang, Liu, Liu, & Tang, 2019). Eksozomların biyolojik işlevinde önemli belirsizlikler bulunmasına rağmen, antijen sunumu, immün yanıtlar, hücresel sinyal iletiminde oldukça etkili özellikleri olabileceği, son yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur. Hücre içinde olduğu gibi hücre dışında da strese karşı koruyucu etkileri bulunabileceği gibi işlevsel açıdan zıt bir görünümde sergileyebilir. Eksozomlar, neredeyse tüm ökaryotik hücreler tarafından salınabilirler. Hücre tipinin işlevinin ve hücrenin sahip olduğu diğer özelliklerin, eksozomal kargonun doğasını yansıttığı söylenebilir (Greening, Gopal, Xu, Simpson ve ark., 2015). Son yıllarda yapılan araştırmalardan elde edilen değerli sonuçlar, eksozomlar ve biyolojik olarak aktif kargolarının, kronik enflamasyonlar, kardiyovasküler ve renal hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, metabolik hastalıklar ve tümörler gibi birçok hastalık ile ilgili prognostik veri sağlayabileceğini göstermektedir. (Liu ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2019).

Eksozomlar, köken aldıkları hücelere bağlı olarak değişebilen benzersiz bir protein bileşimine sahiptir. B lenfositlerinden, dendritik hücrelerden, bağırsak epitel hücrelerinden ve diğer hücre tiplerinden elde edilen eksozomal proteinlerin, İmmün-Elektron Mikroskop lokalizasyon çalışmaları, Western Blot analizi ve peptid kütle haritalaması yöntemleriyle eksozomların ortak ve hücre tipine özgü proteinlerinin

varlığı ortaya konmuştur (Schorey, Cheng, Singh, & Smith, 2015). Ekzozomal oluşum ve multiveziküler cisimlerin taşınması, transport için gerekli endozomal ayrılma kompleksi (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport; ESCRT*) proteinleri tarafından düzenlendiğinden, bu proteinler ve yardımcı proteinlerinin (Alix, TSG101, HSC70 ve HSP90β), köken aldıkları hücre türünden bağımsız olarak eksozomlarda bulunması beklenir. Ayrıca sitoskeletal proteinler, trimerik G proteinlerinin alt birimleri ve tetraspaninler (CD9, CD63, CD81, CD82) eksozomların yaygın proteinleri arasında yer almaktadır. Bu protein grupları, eksozomların varlığını ortaya koyduğundan ekzozomal marker proteinleri olarak isimlendirilir (Vlassov, Magdaleno, Setterquist, & Conrad, 2012). Son yıllarda yapılan çalışmalar, bazı ekzozomal biyogenez süreçlerinin *ESCRT* mekanizmasından bağımsız olarak da gerçekleşebileceğini öne sürmüştür. *ESCRT-bağımsız* mekanizmalarda eksozomların CD63 taşınması sebebiyle, alternatif mekanizmanın sfingomiyelinaz enzimine bağlı gerçekleştiği düşünülmektedir (Trajkovic ve ark., 2008).

Eksozomların farklı hücre ve doku tiplerinde oynayabileceği çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik rolleri umut vadettir. Eksozom biyolojisini bir terapötik veya tedavi stratejisi olarak kullanmak için birçok fırsat olduğu açıktır. Chaput ve ark. yaptığı bir çalışmada dendritik hücrelerin, pro-enflamatuvar veya anti-enflamatuvar eksozom (dendritik hücre kökenli eksozom) üretmesine yönelik modülasyon stratejisi geliştirilmiştir (André ve ark., 2004). Ayrıca kanser aşılari, hümmoral immünite modülasyonu, transplant tolerans endüksiyonu, gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonları, romatoid artrit gibi birçok heyecan verici alanda eksozom stratejileri ortaya konmuştur (Monguió-Tortajada, Lauzurica-Valdemoros, & Borràs, 2014; Nazimek, Bryniarski, & Askenase, 2016). Farklı terapötik yaklaşımlarda, nano-taşıyıcılar olarak eksozomların kullanımına yönelik çalışmalar devam etmektedir (Wang ve ark., 2020).

Eksozom araştırmalarında en çok ilgi çeken konu, hastalıklar için biyolojik belirteçler olarak kullanılma ihtimalinin değerlendirilmesidir. Parkinson hastalığı ile ilgili yapılan bir çalışmada, hem plazmada hem de BOS'da (BOS, beyin-omurilik-sıvısı) parkinson hastalığı ile ilişkili bir protein olan alfa sinüklein içerdiği

gösterilmiştir (Atik, Stewart, & Zhang, 2016). Bir başka çalışmada, glioblastoma biyolojik belirteci olarak eksozomlar araştırılmıştır (Jiang ve ark., 2018). Bir diğer çalışmada, idrardan izole edilen eksozomların akut böbrek hasarının belirteci olma yeteneğini göstermiştir. Ayrıca, eksozomlar pankreas ve akciğer kanseri için biyolojik belirteç olarak önerilmiştir (Kang, 2020). Bir başka uygulama alanı, eksozomların biyobelirteçlerin taşıyıcısı olarak kullanılmasıdır. Eksozomlar, bu yöntemle hastalığın teşhisi, hastanın tedaviye yanıtının izlenmesi ya da takip edilmesi için kullanılabilir. Eksozomların, hastaların tedaviye yanıtının izlenmesi, klinik ortamda bu veziküllerin potansiyel bir uygulama alanıdır. Seçilen hastalığın belirteci, doğrudan hastalıkla ilişkili ise ve hastanın tedavisi uygun şekilde ilerliyorsa, hastanın biyobelirteçlerinde farklılıklar izlenmelidir (Doyle & Wang, 2019). Eksozomların diğer potansiyel rollerinin dışında, klinik ortamda doğrudan tanı, takip ve tedaviye yönelik rolleri oldukça umut verici görünmektedir.

Viral ve bakteriyel patojenler, patojen replikasyonunu, hayatta kalma sinyallerini ya da patolojiyi artırmak amacıyla eksozom fonksiyonlarını değiştirebilir ya da bozabilirler (Zhang ve ark., 2018). Hücreler, lokal ve uzak bölgelerdeki hücrelerin tepkisini ve bu tepkileri kontrol eden düzenleyici faktörleri aktarmak için ekstrasellüler vezikülleri kullanır. Viral veya bakteriyel enfeksiyondan etkilenmiş olan hücrelerde eksozom mekanizması, alıcı hücrenin fenotipini değiştirebilecek, patojen kökenli faktörleri de kargo olarak kabul edebilir. Ekstrasellüler veziküllere paketlenen birçok patojen kökenli faktörler, ESCRT proteinleri veya ilgili kargonun diğer proteinleriyle etkileşime geçerek, enfeksiyonun artırılmasını ve anti-patojen konak tepkilerinin susturulması için kullanılabilir (Rodrigues, Fan, Lyon, Wan, & Hu, 2018). Bakteriyel enfeksiyonlar ve eksozomlar ile ilgili yapılan çalışmalar, eksozomların birbirine zıt rollerinin ortaya konulmasıyla sonuçlanmıştır (Crenshaw ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2018). Eksozomlar, bu tür enfeksiyonlarda, konak hücre bağışıklık tepkisini artırarak, konağı korumaya yardımcı olabileceği gibi, aynı zamanda enfeksiyonun yayılmasına destekte olabilir. Giri ve Schorey'in yaptığı bir çalışmada, *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG/verem aşısı) ile enfekte olmuş ve enfekte olmamış fare makrofajlarından elde edilen eksozomları birlikte inkübe etmiştir. İnkübasyonun ardından, enfekte olmuş makrofajlardan kökenlenen eksozomların CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinde IFN- γ üretimini uyardığı gözlenmiştir

ancak enfekte olmamış makrofaj-kökenli eksozomlar böyle bir uyarımı gerçekleştirmemiştir (Giri, & Schorey, 2008). Bu durum eksozomların, her iki T hücresi için önemli bir antijenik faktöre sahip olduğunu düşündürmüştür. Eksozomların pro-enflamatuvar yanıtları desteklediği, *Mycobacterium spp*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Cryptococcus neoformans* gibi çeşitli bakteri enfeksiyonlarında gösterilmiştir (Jones ve ark., 2018). Eksozomların ayrıca antijene özgü T hücre yanıtının aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Khruh-Garcia ve ark., tüberkülozun tanısında eksozomların biyobelirteç olarak kullanılması amacıyla MRM (çoklu tepki monitörizasyonu) yöntemini optimize etmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemle, tüberküloz hastalığının latent ya da aktif evresinde olmasından bağımsız olarak eksozomlar yardımıyla hastalığın tanısı mümkün hale gelmiştir (Jones ve ark., 2018; Kruh-Garcia, Wolfe, & Dobos, 2015).

Eksozomların, biyolojik rollerine dair oldukça ilgi çekici özellikleri bulunmaktadır. Mevcut literatürde, araştırma konusunda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu doğrultuda, araştırmamızda brusellozun kronik ve akut evrelerinde, eksozomların hangi hücrelerden köken aldığına belirlenmesi, eksozom immünofenotiplemesini yapmak, brusellozun kronikleşmesinde eksozomların etkisini ortaya koymak, brusellozun immunopatogenezinde eksozomların potansiyel rollerine dair literatüre katkılar sunmak amaçlandı. Brusellozun tanı, tedavi ve takibine yeni bakış açıları kazandıracığına inandığımız bu araştırmanın ilgili literatüre önemli katkılar sağlayacağını düşünmekteyiz.

2-GENEL BİLGİLER

2.1. *Brucella* Türlerinin Genel Özellikleri

Brucellaceae ailesi (Family III), *Brucella* cinsini ve *Alphaproteobacteria* sınıfındaki *Rhizobiales* takımının filogenetik üyeleri olarak bilinen *Daeguia*, *Mycoplana*, *Ochrobactrum*, *Paenochrobactrum* ve *Pseudochrobactrum* olmak üzere beş diğer cinsi içerir (Şekil 1). *Brucella* bakterilerinin genetik olarak birbirine benzeyen 12 adet türü bulunmaktadır (Meyer, 1981) (Tablo 1). Konak özellikleri ve patojenite özelliklerine göre ayrılan bu türler virülans bakımından bazı memeli canlılarla sınırlandırılmıştır. *Brucella* bakterilerinin büyük bir genoma sahip olması ve farklı çevrelerde bulunabilmesi potansiyel olarak adaptasyon yeteneklerinin güçlü olmasıyla ilişkilendirilir. *Brucellaceae* ailesinin diğer cinslerine ait türler çoğunlukla çevresel faktörlerden izole edilirken, *Brucella* türleri hayvanlardan ve insanlardan izole edilmiştir (Xavier, Costa, Paixao, & Santos, 2009).



Şekil 1. *Brucellaceae* ailesi filogenetik ağacı (pHYLOT v.2.0 ile oluşturulmuştur)

Tablo 1. Bilinen *Brucella* türleri ve özellikleri (Meyer, 1981)

Türler	Etkin Bölge	Konak	İnsan Vakaları
<i>B. melitensis</i>	Akdeniz Bölgesi, Arap Yarımadası	Koyun, keçi	Var
<i>B. abortus</i>	Asya, Avrupa	Sığır	Var
<i>B. suis</i>	Latin Amerika, Asya, Avrupa	Domuz	Var (biyovar-1)
<i>B. canis</i>	Almanya, Çin, Japonya	Köpek	Nadir vakalar
<i>B. ovis</i>	ABD, Güney Afrika, Arjantin	Koyun	Bildirilen vaka yok
<i>B. neotomae</i>	ABD	Kemirgenler	2 vaka bildirildi
<i>B. microti</i>	Avrupa	Tarla Faresi	Bildirilen vaka yok
<i>B. ceti</i>	Kuzey Yarım Küre	Deniz Memelileri	Laboratuvar kaynaklı 1 vaka bildirildi
<i>B. pinnipedialis</i>	Kuzey Yarım Küre	Deniz Memelileri	Bildirilen vaka yok
<i>B. inopinata</i>	Belirsiz	Belirsiz	1 vaka bildirildi
<i>B. papiionis</i>	Belirsiz	Babunlar	Bildirilen vaka yok
<i>B. vulpis</i>	Avusturya	Kızıl Tilkiler	Bildirilen vaka yok

Brucella bakterileri aerobik ve çubuk şekilli morfolojiye sahiptir. Gram-negatif bakteriler olan *Brucella* türleri, spor üretmezler. Mikroskop altında oval olarak görünebilirler ve diğer bakteriler düşünüldüğünde, küçük yapıda bir profil sergilerler, çap olarak 0.7 um ve uzunluk olarak 1.5 um'e varan boyutlardadır (Verger ve ark., 1998). Hareketsiz türler olan *Brucella* bakterileri, bazı bakterilerde gözlenen kamçı yapısından yoksundur. Bu bakteriler, dış hücre zarına yakın ince bir hücre duvarı bulundurlar. Dış hücre zarı ise güçlü bir lipopolisakkarit formu (LPS) ve üç ana protein grubuna sahiptir (Cardoso, Macedo, Azevedo, & Oliveria, 2006). *Brucella* türlerinin plazmitleri doğal olarak bulundurduğuna dair herhangi bir bulguya ulaşılamamasına rağmen, genetik mühendisliği yöntemleriyle bu bakterilerde plazmitlerin kullanımı oldukça kolay görünmektedir (Rigby, & Fraser, 1989).

Gram-negatif bakterilerin, hücresel yapılarının karakteristik özelliği LPS yapılarıdır. *Brucella* bakterileri, LPS'i yapısal olarak iki formda oluşturabilir. Düz formlarda, dış zarda bir tam uzunlukta bir LPS bulunurken, diğer formda O-zinciri

bulunmaz (Casabuono ve ark., 2017). *Brucella* bakterileri, birçok ortamda (su, toprak, et ve süt ürünleri, dışkı, toz vb.) uzun süre hayatta kalabilirler. Bu bakterilerin yok edilmeleri için ise bazı koşullar gereklidir, örneğin 60°C’ de 10 ila 15 dk ya da % 0,1 fenol içerisinde 15 dakika maruziyet bu bakterilerin harap olmasına yol açar (Sözen, 1996). Thayer-Martin veya Farrel medyumları, bu bakterilerin izolasyonu ve seçilimi için uygundur. *Brucella* türleri 20°C ile 40°C sıcaklık aralığında çoğalabilir ancak optimal 37°C’de 4-6 gün inkübasyondan sonra olgunlaşırlar (Ledwaba, Ndumnego, Matle, Gelaw, & Van Heerden, 2020). Sadece iki *Brucella* türünde (*B. abortus* ve *B. bovis*) optimal büyüme için CO₂ gereklidir. Farklı *Brucella* türleri deneysel olarak farklı büyüme özellikleri ve gereksinimlerine göre (CO₂, Hidrojen Sülfid üretimi, serolojik özellikler) ayrılabilir (Pérez-Etayo ve ark.,2018).

Brucella bakterilerinin karakteristik özelliklerinden biri iki kromozomlu yapısıdır. (1.17 ve 2.1 Mb). Her iki kromozom da aynı G+C oranına sahiptir ve kodlama bölgeleri çoğunlukla benzerdir (Michaux ve ark., 1993). *Brucella melitensis*’in gen sekanslama sonuçlarına göre, bu bakterilerin virulans faktörlerine ilişkin sonuçlar elde edilmiştir. Tip-I, Tip-II ve Tip-III sekresyon sistemleri eksprese edilmezken flagella spesifik Tip-III, Tip-IV ve Tip-V sekresyon sistemlerinin yanı sıra adhezinler, invazinler ve hemolizinlerin eksprese olduğu bulunmuştur (Delveccihö ve ark., 2002). Ortaya konan bu lokusun temel metabolik, fonksiyonel ve replikatif özellikleri bu genetik materyallerin bir mega-plazmidten çok kromozom olduğu görüşünü desteklemiştir (Halling ve ark., 2005).

2.2. Brusellozun Tarihçesi

Bruselloz için birçok kaynakta, tarih boyunca ihmal edilmiş bir hastalık olarak bahsedilir. Bruselloz tarihi, *Brucella* bakterilerinin izolasyonu ile başlamamıştır. Bruselloz’a dair ilk kanıtlar 2.4 ile 2.8 milyon yıllık olduğu düşünülen bir hominidde (*Australopithecus africanus*) iskelet lezyonları ile gözlenmiştir (D’Anastasio, Zipfel, Moggi-Cecchi, Stanyon, & Capasso, 2009). M.Ö. 400’lü yıllarda Hipokrat’ın da *Epidemikler* adlı yazısında belirttiği gibi, bruselloz olgularıyla ilişkilendirilebilen, ısrarcı ateş, eklem ağrıları ve tümör yapıları oluşturma gibi belirtileri olan bir klinik sendrom bildirilmiştir (Hippocrates, MÖ.450 ; Pappas ve ark., 2006). Ünlü yahudi din

adamı Paul the Apostle'ın da bu Malta adasında bu hastalığa yakalandığı “etimdeki diken” olarak belirttiği hastalığın bruselloz olduğu düşünülmektedir. Ayrıca büyük felaket Vezüv Dağının volkanik olarak patlaması ile bazı karbonize yiyeceklerde kokus-benzeri morfolojik olarak *Brucella* bakterilerine benzer yapılar gözlenmiştir (Capasso, 2002).

Bruselloza dair en erken tanım Marston tarafından 1859 yılında yapılmıştır. Kendinin de müzdarip olduğu bu hastalığı Tifo Ateşi'nden farklı bir hastalık olarak tanımlamıştır. Sonraları Akdeniz ateşi olarak tanımlanan hastalık, Kraliyet Donanmasındaki askerlerde, romatizmal komplikasyonların eşlik ettiği kronik bir rahatsızlık olarak tanımlandı. 1884 yılında Yüzbaşı David Bruce Malta'ya giderek, birkaç arkadaşıyla birlikte araştırmalarına başladı. Bu araştırmalar sırasında, *Micrococcus melitensis* bakterisi, insan dalaklarından izole edildi (Rahman ve ark., 1970). Theomisticles Zammit, keçi sütünden bakteriyi izole ederek, pastörize edilmeyen keçi sütü ve dalgalı ateş arasında bir ilişki buldu. Bu doğrultuda 1904 yılında Akdeniz Ateşi Komisyonu (Mediterranean Fever Commission) orduda keçi sütü tüketimini yasaklayarak, sütlerin sterilize edilmesi gerektiği fikrini önermiştir (Wyatt, 2013). Yıllar sonrasında Bang, düşük sığır yavrularından insana bulaşma emareleri gözlemiş ve *Brucella abortus* izole ederek, hastalığı Bang hastalığı olarak tanımlamıştır (Webb, & Webb, 1948). 1918 yılında Alice Evans, Bang hastalığı ve Malta ateşi arasındaki benzerlikleri ve ilişkili mikroorganizmaları ilişkilendirerek, David Bruce'un onuruna bu bakterilere *Brucella* ismini vermiştir (Evans, 1918). Sonrasında keşfedilen diğer türler, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Brucella ovis*, *Brucella neotomae* isimleri de bu doğrultuda verilmiştir (Sümerkan ve ark., 2008)

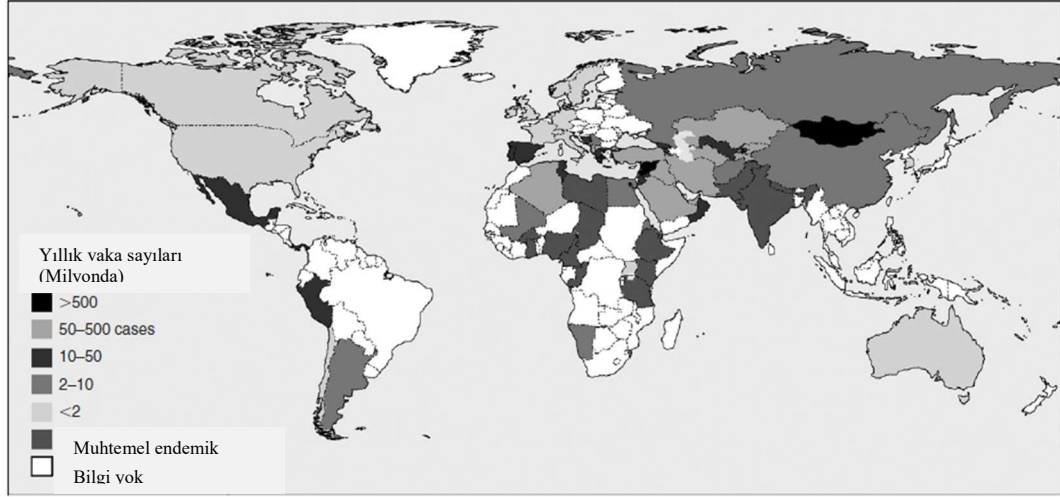
Türkiye'de “Malta humması” yada “Akdeniz humması” olarak bilinen Bruselloz, ilk kez 1905 yılında Kuleli Askeri Hastanesinde, Mehmet Sabit Akalın ve Hüsamettin Kural tarafından bir erde tespit edilmiştir. Bu yıllardan itibaren, sığır ve koyunlardan bakteriler izole edilmiştir. Modern hemşireliğin öncüsü kabul edilen Florence Nightingale'in bu hastalığa Kırım Savaşı sırasında İstanbul da yakalandığı düşünülmektedir (Baysal ve ark, 1999).

2.3. Bruselloz Epidemiyolojisi

Bruselloz'un ekonomik ve sosyal etkileri, ülkelerin tarım ve hayvancılık sahalarına büyük zararlar verebilmektedir. Dünya'nın birçok kısmında Bruselloz enfeksiyonları varlığını sürdürmektedir. İleri hayvan ve insan sağlığı uygulamalarıyla gelişmiş birçok ülkede, Bruselloz bir tehdit unsuru olmaktan çıkmıştır. Ancak, Akdeniz Bölgesi, Ortadoğu, Batı Asya, Afrika ve Latin Amerikanın bazı bölgelerinde Bruselloz etkinliğini güçlü şekilde sürdürmektedir. Ülkelerin bazı tarımsal ve halk sağlığı politikalarını standardize edememesi ile doğrudan ilişkili olan hastalık, düşünülenin aksine yüksek bir prevalansa sahiptir (Gul, & Khan, 2007). Dünyada bruselloz insidansının en yüksek olduğu ülkeler, Suudi Arabistan, İran, Filistin, Suriye, Kuveyt ve Umman olarak bildirilmiştir. 2011 yılından itibaren Suriye'de süren iç savaş sebebiyle, birçok Suriyeli vatandaş ülkelerini terk etmek zorunda bırakılmıştır. Avrupa'da birçok ülkede, Suriyeli vatandaşların göçünden kaynaklanan bruselloz vakaları bildirilmiştir (Deyi ve ark., 2021; Grunow ve ark., 2016).

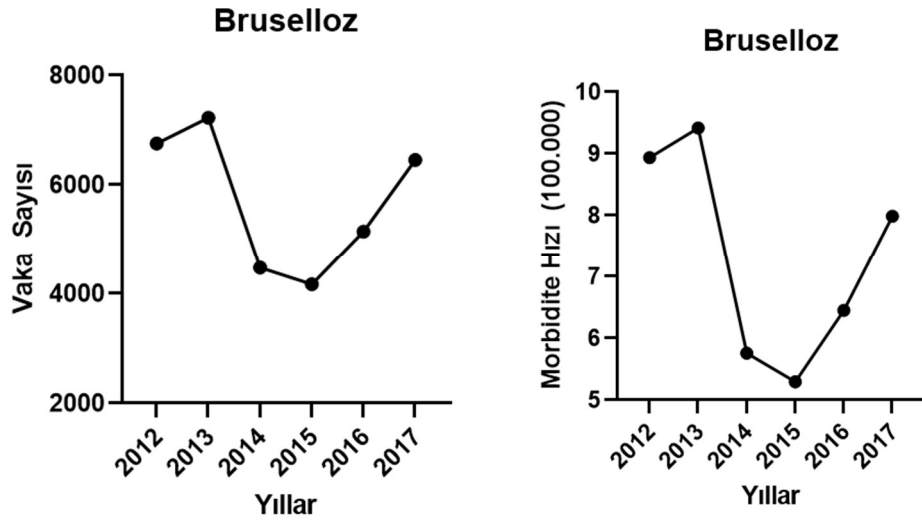
Bruselloz, zoonotik bir enfeksiyon olduğundan önemli bir halk sağlığı problemidir. Hayvanlarla yakın teması bulunan, çiftçiler, veterinerler ve hayvancılık endüstrisi içerisinde aktif iş sahalarında bulunan kişiler için risk yüksek olmasına rağmen, birçok hasta besin ürünleri yoluyla hastalığa yakalanmıştır. *B. melitensis* ve *B. abortus*, hastalığın endemik olduğu bölgelerde, sıklıkla süt tüketimi yoluyla insanlara bulaşmaktadır. Hastalığın ölüm oranı düşük olmasına rağmen, morbiditesi yüksektir (Corbel, 2006).

Birçok ülkede, *B. melitensis* brusellozun en önemli türü olarak görülmektedir (Şekil 2). *B. abortus* ve *B. suis* enfeksiyonlarının da ülkelerin çeşitli politikalarına ve hayvancılık sistemlerine göre baskın olduğu bölgeler bulunmaktadır. Coğrafi bölgelere göre *Brucella* türlerinin çeşitli biyovar ve suşlar rapor edilmiştir. Libya, Umman ve İsrail'de *B. melitensis* biyovar-1, Türkiye ve Suudi Arabistan'da biyovar-2 izole edilmiştir (Refai, 2002). *B. melitensis* biyovar-3 ise, ülkemiz de dahil olmak üzere geniş bir coğrafi bölgede bulunmaktadır (Halling, & Boyle, 2002).



Şekil 2. Dünya genelinde yıllık vaka sayıları (milyonda) (Pappas ve ark., 2006)

Ülkemizde, Bruselloz'un farklı kırsal bölge ve şehirlerde etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre, 1970 yılında 37 bruselloz vakası bildirilmiştir. Gelişen tarım, hayvancılık ve sağlık politikalarının yanı sıra, ilerleyen tıbbi teknoloji, günümüzde daha doğru analiz imkânı vermektedir. Günümüzde insanlar arasında, %1,5 le %25 arasında bruselloz prevelansı bulunmaktadır (Wang, & Jiang, 2020). Ancak, riskli gruplarda (veteriner hekimler, hayvancılık sektörü, kasaplar ve süt ve süt ürünleri enstitüsü) bu oran daha yüksektir. Bruselloz enfeksiyonları, düşünüldüğü gibi hayvancılık sektörünün gelişmiş olduğu Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgelerinde yüksek insidans göstermektedir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2017 yılı vaka sayısı 6457 olup, 2008'den 2017'e kadar yalnızca 1 ölüm vakası bildirilmiştir (THSK, 2017) (Şekil 3). Ancak ülkemizde hastalık bildirim oranları istenilen seviyelerde olmadığından, bu sonuçlar muhtemelen tablonun tamamını göstermemektedir.



Şekil 3. Sağlık Bakanlığı verilerine göre düzenlenmiştir. 2012-2017 yılları arasında Bruselloz vaka sayıları ve morbidite hızı (100.000)

2.4. Bulaşma

Hayvanlarda bruselloz, her yaş grubunda görülebilir ancak genellikle cinsel olarak olgunlaşmasını tamamlamış hayvanlarda yaygındır. Hayvanların genel bulaş yolları, kirli ortam (su ve besin), hamilelik, doğum ve düşük durumlarıdır. Hasta hayvan kökenli ürünler (süt, idrar, plasenta, mukus sekresyonları), sıklıkla hastalık etkeni bakteriyi içermektedir (Adams, 1998). Hayvanlarda ayrıca göz sıvısı ve solunum yoluyla bulaşmalar da rapor edilmiştir (Coelho, Diez, & Coelho, 2015). Doğal yaşamın bir unsuru olarak hastalığın bulaşmasında dişi hayvanların daha büyük etkisi mevcuttur. Hastalığa sahip erkek hayvanlar, yaşamlarının sonuna kadar hastalığı ihtiva etse bile, bulaştırıcılığı oldukça düşük bir seviyede tutarlar (Pappas ve ark., 2006).

İnsanlarda bruselloz vakalarının neredeyse tamamında, enfekte hayvanlara veya hayvan kökenli biyoürünlere maruziyet sonucu bulaş görülmektedir. Hastalığın, hayvanlara ve insanlara bulaşma oranı birbiriyle güçlü şekilde ilişkilidir. Hijyen koşullarının yetersizliği, kötü hayvan politikaları, tüketim alışkanlıkları ve riskli meslek gruplarını koruyucu önlemlerdeki aksamlar, hastalığın bulaşmasında en önemli etkenlerdir (Jaber, Dahan, & Harrari, 1999). Hastalığın endemik olduğu birçok bölgede, enfeksiyonların ilk kaynağı çiğ süt ve çiğ süttten yapılan ürünlerdir. Son

yıllarda yapılan bazı çalışmalar, temel süt ürünlerinin yanı sıra, krem peynir, tereyağı ve dondurma gibi gelişmiş ülkelerde tüketim sıklığının fazla olduğu ürünlerin muhtemel olarak şüpheli olduğu bildirilmiştir. *Brucella* bakterilerinin krem peynirde birkaç gün, dondurma ve tereyağı gibi ürünlerde ise haftalarca canlılığını koruyabildiği tespit edilmiştir (Yumuk, & O'Callaghan, 2012). Kaşar peynir ve yoğurt gibi ürünlerde ise propiyonik ve laktik asit fermentasyonu sayesinde bulaşma riski yok denecek kadar azdır (Pappas ve ark., 2006). Bazı gelişmiş ülkelerde pastörize süt ürünlerinin kullanılması yaygındır, bu bölgelerde nadiren görülen vakalarda en temel bulaşma faktörü temastır. Et ve et ürünleri ile bulaş genellikle çok nadir gözlenmektedir. Kas dokusundaki bakteri mikroorganizma sayısının düşük seyretmesine rağmen bazı durumlarda, az pişmiş ya da pişmemiş ürünlerden bulaş olabilmektedir (Öztürk, Soysal, & Altaş, 1993). Bunun yanında hastalığın cinsel ilişki, transplantasyon ve gebelik sırasında fetüse bulaştığına dair bazı durumlar bildirilmiştir (Tian, Zhan, & Zhang, 2019).

Brusellozun bulaşma ihtimalinin yüksek olduğu yerlerde çalışan bazı riskli meslek grupları vardır. Hastalığın endemik olarak seyrettiği bazı ülkelerde, çiftçiler, veterinerler, kasaplar, laboratuvar çalışanları, hayvan bakım personelleri gibi bazı mesleklerde, gerekli önlemler alınmadığından hastalığın bulaşması kayda değer derecede artmıştır. Koruyucu giysiler, iyileştirilmiş hijyen koşulları ve hastalık ile ilgili eğitimler, bulaşma oranını minimum seviyeye indirecektir (Doğanay, & Meşe-Alp, 2008). Ayrıca patojenlerin solunması, aşılama kazaları ve plenta ile temas dikkat edilmesi gereken başka noktalardır (Seyman, Asik, Sepin-Ozen, & Berk, 2015).

2.5. Klinik Bulgular

Bruselloz, spesifik olmayan belirti ve semptomları olan ve sıklıkla yanlış teşhis koyulan sistemik bir bakteriyel enfeksiyondur. Hastalığın teşhisinden hemen sonra anti-mikrobiyal tedavi gereklidir ve yetersiz tedavi hastalıkla mücadelenin süresini uzatır. Hastalığın kuluçka dönemi değişkenlik gösterir. Hayvanlarda kuluçka süresi yaş, cinsiyet, enfeksiyona maruziyet yükü, gebelik ve hayvanın immün yanıtından etkilenir (Ariza, Pellicer, Pallares, Foz, & Guidol, 1992). İneklerde, enfeksiyona maruziyet süresi, şekli ve yükünün hastalığın sonuçlarına etki edebildiği gösterilmiştir.

Bu etkenlere bağımlı olarak, hasta hayvanlarda kısırılık, süt üretiminin azalması ve östrus siklusunda değişkenlikler gözlenir. Hastalık bugüne kadar, sığır, keçi, köpek ve domuzlarda kısırılıkla ilişkilendirilmiştir (Corbel, 1988).

İnsanlarda, bruselloz spesifik olmayan ancak bazı karakteristik semptomları bulunan bir sistemik bir enfeksiyondur. Hastalığın semptomları, sadece birkaç gün içinde gözlenebildiği gibi, 2 yıldan fazla sürmesi de olası bir sonuçtur (Buzgan ve ark., 2010). Temel olarak, ateş, yorgunluk, iştah kaybı, kas/eklem ağrıları ve depresyon gibi semptomları mevcuttur. Ancak hastalığın sistemik durumuna bağılı olarak, klinik olarak geniş spektrumlu bir model sergilemektedir (Benjamin, & Annobil, 1992). Her dört hastadan birinde solunum semptomları ortaya çıkar ancak radyografiler genellikle normaldir. Ayrıca brusellozda mide bulantısı, öksürük ve göğüs ağrısı gibi semptomlar da gözlenebilir (Mili, Auckenthaler, & Nicod, 1993). Kronik granülatöz şekilde ilerleyen enfeksiyon, aniden ya da yavaşça gelişebilir. Hastalığın kuluçka süresi genellikle 1-3 haftadır ancak bazen birkaç ayı da bulabilir (Winn, & Koneman, 2017).

İnsanlarda klinik bruselloz seyri genellikle mikrobun patojenitesi ve immün sistem mekanizmalarının etkinliği ile şekillenir. Brusellozda hastalık semptomlarının seyri ve süresine göre sınıflandırma yapılmıştır (Tablo 2) (Doğanay ve ark., 2008). Akut brusellozda, güçsüzlük, ateş, baş ağrıları, eklem ağrıları, dermatolojik bulgular ve gastrointestinal sistem bozuklukları gibi semptomlar görülebilir. Akut bruselloz, tedavi edilmez ise, ölümle sonuçlanabilir. Semptomları genellikle 8 haftadan daha kısa sürer. Sub-akut bruselloz sınıflandırması ya da kronik evreye geçiş dönemi olarak adlandırılan bu evre 2 aydan 1 yıla kadar sürebilir. Akut bruselloz benzeri semptomlar gözlenir ancak daha zayıf görünümüdür (Ertek, 2003). Hastalık 1 yıldan fazla sürdüğünde ise kronik bruselloz sınıflandırması yapılır. Osteoartiküler sistem, karaciğer hasarları ve nörolojik semptomlar hastalığın bu evresinde gözlenebilir (Ficht, 2003). Bu sınıflandırmanın dışında, son yıllarda gündeme getirilen bazı bruselloz terimleri de mevcuttur. Sub-klinik ya da asemptomatik bruselloz, metabruselloz ve bruselloz allerjisi kavramları sınırlı olarak bazı araştırmalarda tanımlanmıştır (Galińska, & Zagórski, 2013).

Tablo 2. İnsan brusellozunun klinik sınıflandırması

Sınıflandırma	Semptom Görülme Süresi	Semptomlar
Sub-klinik	-	Aseptomatik
Akut/Sub-akut	2 ay- 1 yıl	Ateş, terleme, baş ağrısı yorgunluk, splenomegali, hepatomegali
Kronik	>1 yıl	Nöropsikiyatrik sendromlar, Karaciğer hasarları, Osteoartiküler sistem bozuklukları

Ateş, brusellozda en yaygın belirti olarak kabul edilir. Yetişkin vakaların %90'ından ve çocukların ise %85'inden fazla vakada ateş semptomu bildirilmiştir. Brusellozda ateşin her ne kadar diğer hastalıklardan ayırt edici bir karakteristiği bulunmasa da, son derece değişken bir görüntü çizer (Madkour, 2012). Brusellozda ateş, dinlenme durumunda düşüş sergilerken, spor faaliyetlerinden sonra artış göstermiştir. Hastalığa ateş ile birlikte genelde titreme de eşlik eder ve yüksek ateşle ilişkili görünmektedir. Bir başka semptom ise terlemedir, genellikle hastalığın şiddeti ile doğru orantılı olarak gelişmektedir. Eklem, bel ağrıları ve kas ağrıları genellikle bruselloz enfeksiyonlarında sıklıkla görülür (Liu ve ark., 2020). Hastalığı ağır şekilde seyreden bireyler genellikle yatar pozisyonda olmayı tercih ederler. Sıklıkla yorgunluk hissi, halsizlik ve herhangi bir fiziksel aktiviteden kaçınma isteği mevcuttur. Brusellozun erken semptomlarından biri de mide bulantısı ve kusmaya eşlik eden anoreksi durumudur. Ayrıca, son yıllardaki bazı çalışmalar, mental bazı rahatsızlıkların da bruselloz ilişkisini ortaya koymuştur (Lim, & Reland, 2004).

2.6. Patogenez

Brusellozda, enfeksiyonun oluşum aşamaları, bakterinin virülansı, konağın direnci, yaşı, cinsiyeti ve diğer faktörlerden etkilenir. *Brucella* türleri konağa, yutma, solunum, konjonktival veya deri sıyrıkları yoluyla girebilir (Bishop, Bosman, & Herr, 1994). Konak ile enfekte olduktan sonra, bu bakteriler reküloendotelial sistemin içerisine geçer (Corbel, 2006). *Brucella* türleri, fakültatif bakterilerdir ve konağın miyeloperoksidaz sistemini baskırlar. Nötrofiller veya mononükleer fagositik

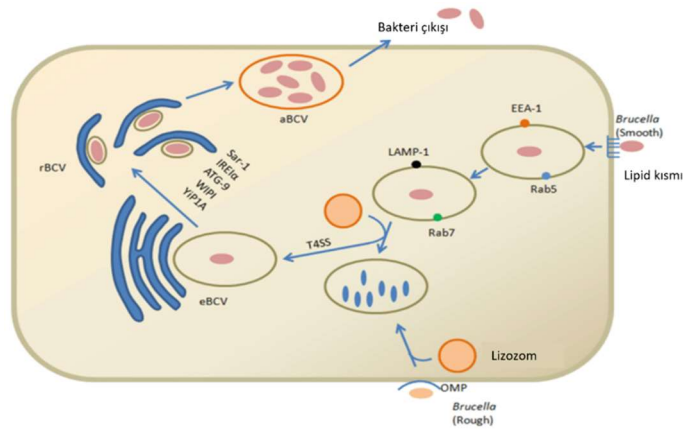
hücreler tarafından fagositoza uğramasına rağmen bu hücreler içerisinde hayatta kalabilirler (Corbel, 1999).

Brucella türlerinin genom analizleri incelendiğinde, toksinler, lifler ve kapsüller gibi bakterilerde bulunan bazı virülans faktörlerinden yoksun oldukları gözlenmiştir. Bu bakterilerin immün sistem savunmasından kaçmak için lizozomal degradasyonu engelleyip, hücre içi trafiği ve hücre içi ortamı kendi yararına modüle ettiği düşünülebilir (de Figueiredo, Ficht, Rice-Ficht, Rosetti, & Adams, 2015). Bunun yanında *Brucella* bakterilerinin TNF- α üretimini bloke eden bazı yolaklar kullanması, virülansın karakterize bir özelliği olabilir (WHO, 1998). IFN- γ üretiminin ise, potansiyel olarak *Brucella* türlerinin proliferasyonunu engellediği, ancak bu bakterilerin ortadan kaldırılması için yeterli olmadığı bilinmektedir (Bishop ve ark., 1994). Bruselloz ile ilgili çalışmalar, düz suşlarda bulunan, endotoksik olmayan *smooth* lipopolisakkaritlerin (S-LPS), enfeksiyonun ilk aşamalarından itibaren, doğal ve edinsel immüitenin gelişimini frenlediği görüşünü desteklemiştir. O-yan zincirine sahip bu LPS'ler, patojeni mikrobisidal etkinliklere karşı dirençli kılmaktadır ve en önemli virülans faktörü olarak bilinmektedir (Cardoso ve ark., 2006; Mancilla, 2016). Bunun yanında diğer form olan O-zincirleri bulunmayan *rough*-LPS (R-LPS)'ler ise konak immün sistem yanıtlarından kaçınmak için daha basit bir yol izler (Cardoso ve ark., 2006).

Bruselloz bakterileri epitel hücreler, fibroblastlar gibi fagositik olmayan hücreleri enfekte edebildiği gibi, monositler, makrofajlar ve nötrofiller gibi fagositik hücreleri de enfekte edebilirler. *Brucella* türlerinin hücre içi trafiği, enfekte ettiği hücrelerin özelliklerine göre değişkenlik gösterir. Epitel hücreler gibi bazı fagositik olmayan hücrelere *Brucella* girişi, bazı reseptör moleküller, aktin filamentleri ve GTPaz aktivasyonu ile gerçekleşir (Moreno, & Gorvel, 2004; Pizarro-Cerdá, Moreno, & Gorvel, 2000). Enfeksiyonun ilk aşamalarında, *Brucella* bakterileri hücrelerin erken fagositik kompartmanlarını hedef alır, buna yanıt olarak konak hücresi ise geç endozomu oluşturur. Geç endozomun oluşması ile lizozom ve fagolizozom yapıları gelişmiş olur. Fagositik olmayan hücrelerde, *Brucella* bakterileri, çoğunlukla otofajik yolak ile endoplazmik retikulum (ER) odaklanır. Bu noktada, *Brucella* bakterileri, tip-1 transmembran glikoproteini olan lizozom ile ilişkili membran proteini 1 (LAMP-1)'i kullanarak ER ile birleşir. Böylece *Brucella* bakterileri fagozomdan uzak durarak

kendilerini tehlikeden korurlar ve ER içinde hücresel fonksiyonlara etki etmeden replike olabilirler (Glowacka, Zakowska, Naylor, Niemcewicz, & Bielawska-Drozd, 2018 ; Moreno ve ark., 2004).

Brucella türlerinin fagositik hücelere geçişi, bazı reseptörler kullanılarak (FcR, C3bR, mannoz-bağlayıcı reseptörler, fibronektin reseptörleri) gerçekleşir. Hücreye bağlandıktan sonra, lipid kısmıyla hücreye giriş yapar. Girişte, lipid kısmı içeriğinde bulunan kolesteroller, glikozilfosfatidilinositol (GPI) ve glikosfingolipitler özellikle kolaylık sağlar (Watarai, 2004). Oponizasyon sağlandıktan sonra, *Brucella* bakterileri, hücrelerin Fc reseptörlerini de etkin şekilde kullanır, hücelere geçiş özgürlüğü sağlandıktan sonra *Brucella* içeren vakuoller oluşmaya başlar (BCV). BCV'nin ilk oluşumunu takiben bakteri konak hücrede, önce erken endozom oluşturmaya başlar, sonrasında geç endozomu takiben lizozom ve fagolizozom yapıları oluşur. BCV yapıları ER'le birleşmek için fagositik olmayan hücelerde yaptığı gibi LAMP-1'i kullanır, ancak bu sadece enfeksiyonun ilk aşamalarında gerçekleşir (Celli & Tsolis, 2015 ; Moreno ve ark., 2004). *Brucella* enfeksiyonunun sonuna doğru LAMP-1 bağımsız hareket eder, ancak kalneksin ve kalretikulin gibi ER şaperonlarına ihtiyaç vardır (Şekil 4). *Brucella* bakterileri, ER içine geçince hücrelerin apoptoz mekanizmalarını durdurur ve replike olmaya başlar (Starr, Ng, Wehrly, Knodler, & Celli, 2008).



Şekil 4. *Brucella* türlerinin hücre içi trafiği (Ahmed ve ark., 2016)

Brucella türleri birçok bakteriden farklı olarak klasik virülans faktörlerine sahip değildir. *Brucella* patojenlerinin en önemli özellikleri, konağı enfekte edebilme kapasiteleri, replikasyon yetenekleri ve konağa karşı dirençleridir (Glowacka ve ark.,

2018). Lipopolisakaritler, gram-negatif bakteriler için en önemli bileşenlerden biridir. *Brucella* bakterileri için, daha önce bahsedildiği gibi, iki tür LPS vardır. S-LPS'ler ve R-LPS'ler olarak tanımlanan bu liposakaritler arasındaki en büyük fark O-antijen yan zincirlerinin varlığıdır. *Brucella* LPS'si klasik bakteriyel virülans faktörleri olan LPS'den ayrılmaktadır. LPS'ler ile ilgili yapılan toksisite çalışmalarında, *Brucella*- kökenli LPS'lerin, diğer bakterilerden kaynaklanan LPS'lere göre çok daha az toksisite sergilediği gözlenmiştir (Forestier, Moreno, Pizzaro-Cerda, & Gorvel, 1999; Goldstein ve ark., 1992). S-LPS veya R-LPS bulunduran *Brucella* türleri, hücre içi trafikte ve hücreye girişte farklılıklar bulundurur. S-LPS'e sahip *Brucella* türleri, üzerinde bulunan lipid katmanları ile hücrelerle etkileşir, ancak R-LPS bulunduranlar lizozomla birleşmeye eğilimlidir (Lapaque, Moriyon, Moreno, & Gorvel, 2005). Brusellozda, bir diğer virülans faktörü ise VirB Tip-IV sekresyon sistemleridir. VirB sekresyon sisteminin hücreye giriş mekanizmalarında, molekül ve protein salgılanmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Son yıllardaki çalışmalar, VceA ve VceC adlı iki proteinin bu sekresyon sisteminde önemli olduğunu düşündürmektedir (de Jong, Sun, Hartigh, van Dijil, & Tsois, 2008). Ancak deneysel çalışmalara göre, bu iki proteinin fagositik olmayan hücrelere girişte ve fagolizozomal birleşmenin engellenmesinde doğrudan etkili olduğunu kanıtlanamamıştır (Delrue ve ark., 2001). *Brucella* türlerindeki önemli diğer virülans faktörleri arasında, iki-bileşenli düzenleyici sistem (BvrS/BvrR), *Brucella* virülans faktörü A (BvfA), şeker ve nitrojen metabolizmaları ve stres proteinleri gösterilebilir (Kohler ve ark., 2002; Lavigne ve ark., 2005).

2.7. Tanı Yöntemleri

Brusellozda tanı koymak, herhangi bir hayvanda ya da insanda hiçbir zaman kolay bir olay olmamıştır. Günümüzde, çoğunlukla klinik incelemelerin, seroloji, hücre kültürü ve moleküler tekniklerle birleştirilmesiyle tanı koyulabilmektedir (Baily, Krahn, Drasar, & Stoker, 1992). Hücre kültürü yöntemleri çok daha tanımlayıcı bulgular sağlasa da, işlemin çok uzun sürmesi ve düşük sensitivite dolayısıyla pratik görünmemektedir (Araj, 2010). Bir diğer tanı yöntemi ise serolojik testlerdir. Serum Tüp Aglutinasyon Testi (SAT), Kompleman Fiksasyon Testi (CFT), Floresan

Polarizasyon Testleri (FPA) ve Enzim-bağlı İmmünosorbent Analizi (ELISA) gibi testler serolojik olarak tanıya yardımcı testlerdir (Alton, Cornet, & Plackett, 1983; Corbel, & Brinley-Morgan 1984; Lucero, Foglia, Ayala, Gall, & Nielsen, 1999; Nielsen, Lin, Gall, & Jolley ve ark., 2000). Bunların dışında, Radyoimmün Test, indirekt immünofloresan testi ve 2-merkaptöetanol testi de brusellozun tanısıyla ilişkilendirilen testlerdir (Colmenero ve ark., 1989; Parrat, Nielsen, & White, 1977). Moleküler açıdan, brusellozun tanısının koyulmasında ise Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ve Real-Time PZR yöntemlerinden bahsedilebilir (Bishop ve ark., 1994) (Tablo 3).

Tablo 3. Brusellozun laboratuvar tayininde kullanılan yöntemler

Serolojik Testler	Kültür Yöntemleri	Moleküler Teknikler
<i>SAT</i>	<i>Klasik Kültür</i>	<i>Standart PZR</i>
<i>RBT</i>	<i>Yarı-otomatize kültür</i>	<i>Real-time PZR</i>
<i>Yanal Akış Testi</i>	<i>Lizis santifüj kan kültürü</i>	<i>Nested PZR</i>
<i>CFT</i>	<i>Pıhtı kültürü</i>	<i>LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)</i>
<i>Coombs Testi</i>		<i>MLVA (Multilocus variable number tandem repeat analysis)</i>
<i>ELISA</i>		
<i>Brucellacapt</i>		

Hücre kültürü yöntemleri, *Brucella* bakterisinin varlığının doğrulanmasında ve kesin tanı konulmasında oldukça önemlidir. Hayvanlarda genellikle, süt, kan, klostrum, plasenta kalıntıları ve mide ürünlerinden örnekler alınarak kültüre edilir. İnsanlarda ise, kan, beyin-omurlik sıvısı ve idrar standart kültür örnekleridir (Bishop ve ark., 1994; Ghassan, Issam, & Alex, 1996). *Brucella* bakterilerinin potansiyel enfeksiyöz yetenekleri, hücre kültür çalışmalarının biyogüvenlik seviye 3

laboratuvarlarında yapılmasını zorunlu kılmıştır (HSGM, 2015). Farklı suşlar için, farklı örnekler daha iyi duyarlılığa sahip olabilir. Bazı çalışmalarda, kemik iliği örnekleriyle yapılan kültürlerin, kan kültürlerine göre daha etkin olduğu gösterilmiştir, farklı türlerde ise tam tersi geçerlidir. Diğer bir unsur ise brusellozun hangi evresinde hücre kültürü çalışmalarına dahil edildiğidir. Genellikle kronik brusellozlu hastalardan alınan örnekler, hücre kültüründe daha yavaş bir büyüme gösterir (Corbel, 1999). Hücre kültürünün yanında, Bruselloz varlığının kanıtına dair destek bir uygulama ise mikroskopik incelemelerdir. Modifiye edilmiş bir Ziehl Nelsen boyaması (Stamp boyaması) *Brucella* türlerinin belirlenmesinde önerilmiştir, ancak boyama reaksiyonun *Brucella*-spesifik olmadığı gözlenmiştir. Mikroskopik temelli incelemeler, hücre kültürünün farklı aşamalarının takibinde yararlı görünmektedir (Baily ve ark., 1992; Bishop ve ark., 1994).

Bruselloz'un tanısında kullanılan serolojik yöntemlerin en yaygını Serum Tüp Aglutinasyon Testi (SAT)'dir. 1987 yılında Wright ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara dayanan bu yöntemde, hastaların antikor düzeyine ait titre analizi yapılmaktadır. Hastaların serum örnekleri seri şekilde dilüe edilerek, antijenle muamele edilir ve tüplerdeki aglutinasyon sonuçları değerlendirilir (Araj ve ark., 2010). Sıklıkla, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* ve *Brucella suis* türlerine özgü IgM ve IgG antikorlarının tespiti için kullanılmaktadır. Hastalığın akut fazında, oldukça yararlı görünmesine rağmen kronik ve sub-akut fazlarda brusellozun tanısının konulmasında etkinliği düşüktür. 1/80'den daha yüksek titreler genellikle hastalığın ikinci yada üçüncü haftasında görülür (Yaylı, 2003). Brusellozun indirekt olarak tanısının koyulmasını amaçlayan aglutinasyon testlerinde hızı ve duyarlılığı ile öne çıkan bir başka test ise Rose Bengal Lam Testidir (RBPT). İlk olarak hayvanlarda hastalık tanısında kullanılmak üzere geliştirilen bu test, günümüzde sıklıkla insanlarda da kullanılmaktadır. 2 ila 4 dakika içerisinde hızlıca sonuç verebildiği ve duyarlılığının %96'dan fazla olması sebebiyle oldukça kullanışlı bir testtir. Ancak tekrarlayan enfeksiyonlarda kullanılması doğru sonuçlar vermeyebilir. *Brucella abortus* 119-3 suşunun Rose Bengal boyası ile boyanması ile elde edilen bir antijen süspansiyonu ve pH'ı 3.65'e ayarlanmış tampon ile analiz yapılır (Bishop ve ark., 1994). Bunun yanında hızlı şekilde sonuç verebilen diğer aglutinasyon testleri ise, Lam

Aglütinasyon Testi (SPOT), Mikroagglütinasyon testi ve Kart testi gibi uygulamalar mevcuttur. Agglütinasyon testleri yetersiz kaldığında, Kompleman Fiksasyon Testi (CFT) uygulaması ile doğrulama yapılabilir. Bu testin sensitivitesi ve spesifitesi yüksek olsa da, tespitinde ihtiyaç duyulan işlemler zorlu olduğundan sınırlı kullanımı mevcuttur (Garin-Bastuji, Blasco, Marin, & Albert, 2006; Królak, & Blaszczyk, 1986).

Brusellozun tanısının konulmasında, diğer serolojik yöntemlerden daha yüksek sensitiviteye sahip bir metod olan ELISA, hastalığa spesifik immünoglobülinlerin tespitini sağlar. Klasik ELISA yöntemlerine göre uygulanması daha kolay ve daha etkili olan Kompetitif ELISA (c-ELISA) yöntemi Bruselloz için öne çıkmaktadır (Saravi, Wright, Gregoret, & Gall, 1995). c-ELISA'da S-LPS'nin polisakkarit yapısındaki yaygın ve bilinen epitoplara karşı monoklonal antikorlar kullanılır. Diğer antijenlerle çapraz reaksiyon göstermesi oldukça nadir olduğundan spesifik bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Nielsen, & Kelly, 1995).

Son 20 yılda, moleküler tekniklerin geliştirilmesi ile birçok hastalığın tanısında kullanılmaya başlayan PZR yöntemi Brusellozun tiplendirmesinde, tespitinde, tedavisinde ve tedavi sonrası izleminde oldukça etkilidir. Vücudun hemen hemen her dokusundan çalışılabilen bu yöntem, enfeksiyonu takiben 10-15 gün sonra bile bakteri varlığının tespitini mümkün kılar (Queipo-Ortuno, Morata, Dcon, Manchado, & Colmenero, 1997). PZR tanı yöntemleri, 16S ribozomal RNA genlerinin daha iyi anlaşılması sayesinde yüksek duyarlılıkla mikroorganizmaların tespitini mümkün kılar. Son yıllarda yapılan evrimsel ve taksonomik değerlendirmeler bu yöntemin aynı zamanda tanı koymada da etkili olduğunu göstermiştir (Bricker, 2002). PZR analizine dayanan çeşitli moleküler yöntemler, *Brucella* bakterilerine özgü bazı diziler bulunduğunu göstermiştir. Geliştirilen otomatize sistemlerle, Brusellozun tanı, takip ve tedavisinde PZR temelli yöntemler kullanımı oldukça yararlı görünmektedir (Queipo-Ortuno ve ark., 2005).

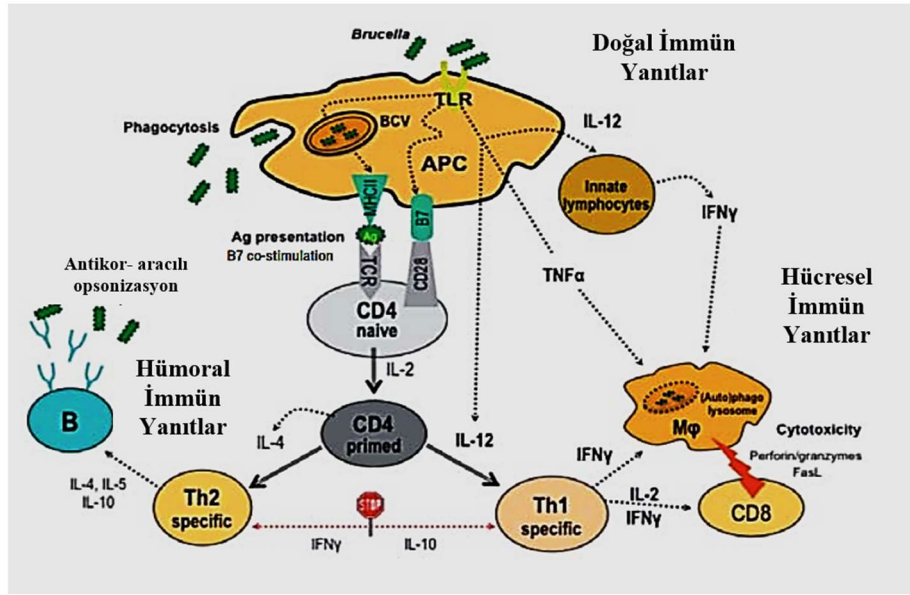
2.8. Tedavi

Brucella bakterileri antibiyotiklere karşı duyarlı olmalarına rağmen, bu mikroorganizmaların hücre içi yerleşimi, antibiyotiklerin ulaşımında terapötik bir güçlük yaratmaktadır. Buna karşın, Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün önerilerine göre

etkili bir antibiyotik kombinasyonu, uygun sürede tedavi hastalıkla başa çıkmak için gereklidir. Tedavide uygun olmayan ilaç seçimi, dozaj ve süre ile birlikte bazı suşların antibiyotiklere gösterdiği direnç tekrarlayan enfeksiyonla ilişkilidir (Solera, Martinez-Alfaro, & Espinosa, 1997). *Brucella* bakterilerine karşı oldukça etkili bazı antibiyotikler bulunur. Yetişkinlerde akut brusellozda, rifampisin, minosiklin ve doksisisiklinin minimum altı hafta kullanımı önerilmektedir. Bruselloza eşlik eden bazı dış enfeksiyonların varlığında ise, rifampisin, tetrasiklin ve aminoglikozid kullanılarak bir kombinasyon elde edilebilir (Alavi, & Alavi, 2013). Relaps, tedavinin tamamlanmasının ardından belirli bir süre geçtikten sonra semptomların tekrar görülmesi veya laboratuvar bulgularıyla mikroorganizmanın varlığının doğrulanmasını ifade etmektedir. Antibiyotiklerin fagositik hücrelere kolayca geçebilecek antibiyotiklerden seçilmesi ve belirlenen tedavilerin etkin şekilde uygulanması ile hastalığın relapsı büyük ölçüde engellenebilmektedir (Pappas, Solera, Akritidis, & Tsianos, 2005).

2.9 Brusellozda Konak İmmün Yanıtı

İmmünpatogenezi iyi bilinen bir hastalığın tedavisi önemli ölçüde kolaylaşır. Brusellozda konağın doğal ve edinsel immün yanıtları henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Brusellozda konak immün yanıtı çalışmaları genellikle fare modellerinde çalışılmıştır. Bruselloza karşı ilk savunma hattı fiziksel bariyerlerdir (epitelyal hücreler/ cilt). Kompleman sistemi, antijen sunan hücreler (ASH), doğal öldürücü (NK) hücreler ve $\gamma\delta$ T hücreler gibi doğal immün yanıt bileşenleri savunmaya katılırlar. Brusellozda edinsel immün yanıtta, humoral immün yanıtlar enfeksiyona karşı yanıtta vazgeçilmez bir unsurları olsa da, hücreli immün yanıtın etkisi daha fazladır (Skendros, & Boura, 2013) (Şekil 5).



Şekil 5. *Brucella* enfeksiyonlarında konak immün yanıtta genel bakış (Skendros ve ark., 2013)

2.9.1. Doğal İmmün Yanıt

Patojenlere karşı ilk savunma hattı genellikle deri ve epitelyal hücrelerdir. Epitelyumun sürekli kendini yenilemesi, bakteri tutulumunu engeller. Bunun yanında, gözyaşı ve tükürük gibi salgılar bakteri yayılımını engeller. Aynı zamanda bu salgılar, içerdikleri lizozim enzimi ve bazı pro-enflamatuvar moleküller sayesinde bakterilerin hücre duvarlarını yıkarak enfeksiyonu engellerler. Benzer şekilde, gastrointestinal sistem ve solunum sisteminde görevli mukus enfeksiyonun hayati organlara yayılmasının önüne geçer.

Makrofaj ve dendritik hücrelerin yer aldığı ASH'ler, konak savunmasında hem doğal hem de edinsel immün yanıtta görevli hücrelerdir. Makrofajlar, *Brucella* bakterilerine karşı merkezi bir rol oynarlar. Fare modelleri ile çalışmalar, bruselloza karşı makrofajlarda bazı gen ekspresyon paternleri hakkında önemli bulgular sunmuştur. Farelerde *B. abortus* enfeksiyonunu ardından BALB/c ve RAW264.7 makrofajları ile yapılan çalışmalarda, hücre içi enfeksiyonun kontrol altına alınması amacıyla bazı sitokinlerin salınımı gözlenmiştir. Enfeksiyondan sonra, artan TNF- α ve IFN- γ iki anahtar sitokin olarak dikkat çekmektedir, bunun yanında IL-1, IL-6 ve IL-12 sitokinlerinin arttığı bulunmuştur. (Baldwin, Jiang, & Fernandes, 1993; Zhan, & Cheers, 1993). İlginç şekilde, insan THP-1 makrofajları ile ilgili yapılan çalışmalarda IL-1, IL6 ve IL-8 artarken TNF- α 'nın baskılandığı gözlemi yapılmıştır (Dornand ve

ark, 2002). *B. suis* ile yapılan çalışmalarda, *Brucella* türlerinde korunmuş dış membran proteini olan Omp25'in TNF- α 'yı baskıladığına dair bulgular ortaya konmuştur, ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. İnsanlarda TNF- α 'nın baskılanması, makrofaj aktivasyonu ve immün yanıtın azalması ile sonuçlanır ve bu durum *Brucella* bakterilerine karşı önemli bir savunma mekanizması olan fagositozun engellenmesine yol açar (Jubier-Maurin ve ark., 2001). Brusellozda dendritik hücrelerin rolleri tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, bazı insan ve fare çalışmalarında ilgi çekici sonuçlara ulaşılmıştır. *Brucella* enfeksiyonu sonrası dendritik hücrelerden bazı yüzey reseptörlerinin yanı sıra, pro-enflamatuvar sitokinler TNF- α , IL-6, IL-10 ve IL-12 salınımının da arttığı gözlenmiştir. Ayrıca *Brucella* türlerinin replikasyon yeteneklerinin monositik kökenli dendritik hücrelerde oldukça gelişmiş olduğu gözlenmiştir (Billard, Cazevieille, Dormand, & Gross, 2005).

Nötrofillerin *Brucella* enfeksiyonlarına cevap veren ilk immün sistem hücresi olduğu düşünülmektedir (Young, Borchert, Kretzer, & Musher, 1985). *Brucella* suşları, opsonizasyonun ardından nötrofiller tarafından hızlıca fagositoza uğrayabilirler. Zayıflatılmış *B. abortus* ve *B. melitensis* patojenleri ile yapılan çalışmalarda, her iki bakteri türünün de nötrofiller tarafından etkili şekilde öldürüldüğü ancak *B. melitensis*'in hücre içi ölüme daha dirençli olduğu bulunmuştur. Bunun yanında bazı *Brucella abortus* suşlarının, fagozom ve lizozom etkileşmesini engelleyerek, nötrofiller içinde hayatta kalabildiği gözlenmiştir (Kreutzer, Dreyfus, & Robertson, 1979). Bu sağkalım, *Brucella* bakterilerinin lenfoid hücrelere göçünde nötrofillerin etkisinin olduğu ve böylece bu bakterilerin yayılmasına destek olduğuna dair bulguları desteklemektedir (Ruiz-Castafieda, 1954).

NK hücreleri, doğal immün yanıtın vazgeçilmez bir bileşeni olarak, birçok mikroorganizmaya karşı savunmanın erken aşamalarında önemli roller oynar. *Brucella* ile ilk etkileşim ASH'ler tarafından kurulur, bu etkileşimin sonucunda IL-12 ve IL-2 gibi sitokinler salgılanır ve NK hücreleri aktive olur (Fernandes, Benson, & Baldwin, 1995). Enfekte olan hücrelerin öldürülmesi ve IFN- γ salınması yoluyla *Brucella* bakterilerine karşı yanıt oluşturur. İnsanlarda, *B. suis* ile yapılan çalışmalarda, aktive olan makrofajların etkisiyle NK hücreleri enfeksiyonun temizlenmesine katkıları sunmuştur. İlginç şekilde farelerde yapılan çalışmalar, NK hücrelerinin *Brucella* enfeksiyonlarının temizlenmesinde, mevcut immün yanıtı değiştirmedeğini ortaya

koymuştur. Ancak bu durum farelerde *Brucella* bakterilerine karşı NK hücrelerinin önemsiz olduğunu göstermez. *Brucella* bakterilerine karşı NK hücrelerinden bağımsız olarak, yeterli bir immün yanıtın sağlandığı düşünülebilir (Dornand ve ark., 2004).

MHC-sınırlı olmayan $\gamma\delta$ T hücreleri ise, birçok enfeksiyona karşı erken yanıtlarda görev alırlar. Peptid olmayan yapıdaki antijenleri tanıyan bu hücreler, spesifik aksesuar moleküllerine, antijen sunumuna ve antijenin işlenmesine ihtiyaç duymazlar (Oliaro ve ark., 2005). Son yıllarda, $\gamma\delta$ T hücrelerinin bir altgurubu olan V γ 9V δ 2 hücreleri bruselloz ile ilişkilendirilmiştir. Bruselloz hastalarından alınan periferik kan örneklerinde arttığı görülen bu hücrelerin makrofajlarda *Brucella* replikasyonunun, TNF- α ve IFN- γ üreterek ve hücrel sitotoksikite mekanizmalarının aktive ederek, engellediği gösterilmiştir (Skendros, Pappas, & Boura, 2011).

2.9.2. Edinsel İmmün Yanıt

Hümmoral immün yanıtlar, *Brucella* bakterilerinin karakteristik hücre içi özellikleri düşünüldüğünde, koruyuculuğu az ve etkileri sınırlı bir görünüm izlerler. Fare ve insanlarda, serolojik tanı yöntemlerinde sıklıkla kullanılan artmış *Brucella*-spesifik Ig (IgM, IgG1, IgG2,IgG3) seviyeleri, patojenin varlığına dair önemli bulgular sunsa da, enfeksiyondaki koruyucu işlevleri tam olarak tanımlanamamıştır (Ko, & Splitter, 2003). Antikor-aracılı opsonizasyonun, bakteri fagositozunu artırdığı ve bunun sonucunda fagositik hücrelerden çeşitli sitokinlerin salınması enfeksiyonun temizlenmesine katkı sağladığı düşünülmektedir (Golding ve ark., 2001).

Hücrel immüitenin temelini oluşturan CD4⁺ yardımcı T hücreler ve CD8⁺ sitotoksik T hücrelerinin bruselloza etkisine dair birçok çalışma yapılmıştır. C57BU10 ve BALB/C farelerde yapılan çalışmalarda, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerin yokluğunun bruselloz enfeksiyonuna doğrudan etki ederek, hastalığı kontrol edilemez bir süreç sürüklediği bulgularına ulaşılmıştır (Oliveira, & Splitter, 1995). Th1 (Yardımcı T hücre-1) hücreleri ve ilişkili sitokinlerin (IFN- γ ve IL-12) brusellozda anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir. Fare modelleriyle yapılan çalışmalarda, IFN- γ eksikliğinde Balb/C farelerde enfeksiyondan 11 hafta sonra ölümler gerçekleşmiştir, vahşi tip (wild-type) farelerde ise bu süre sonunda enfeksiyon kontrol altına alınma eğilimi göstermiştir (Murphy ve ark., 2001). Brusellozda BALB/C farelerde yapılan bir diğer

çalışmada rekombinant IFN- γ tedavisi uygulanmış ve tedavi sonunda tedavi uygulanmayan farelere göre bakteriyel yükte 10 kat düşüş izlenmiştir. Ayrıca BALB/C ve C57BL/6 fare modellerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, monoklonal antikorlarla muamele ile IFN- γ nötralizasyonu, IFN- γ , perforin ve beta 2-mikroglobülindeki gen delesyonlarının *Brucella* enfeksiyonlarına karşı enfeksiyonun kontrolünü güçleştirdiğine dair bulgular mevcuttur (Murphy ve ark., 2001; Zhan ve ark., 1993).

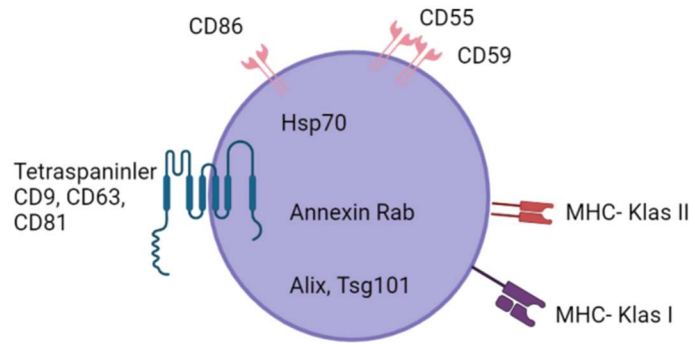
2.10. Eksozomlar

Ekstrasellüler veziküllere (EV) dair ilk tanımlama 1967 yılında insan plazmasında trombosit kökenli ürünleri araştıran Peter Wolf tarafından “trombosit tozu” olarak yapılmıştır (Wolf, 1967). Membran kaynaklı olduğu düşünülen EV’ler üzerine yapılan diğer çalışmalar ile hücre içine doğru tomurcuklanma yoluyla oluşan mikroveziküller keşfedildi. Endozomal kökenli EV’ler 1987 yılında Rose Johnstone tarafından izole edilerek “eksozom” terimi literatüre kazandırıldı (Kowal ve ark., 2014).

EV’lerin kargoları genellikle lipidler, nükleik asitler ve plazma membranı ve sitozol ile ilişkili proteinlerden oluşmaktadır. Boyut, köken aldığı hücre ya da doku ve fonksiyonuna göre eksozomlar, mikroveziküller (MV) ve apoptotik cisimler olarak üç alt gruba ayrılırlar (Cocucci ve ark., 2009). Plazma membranından oluşan EV’ler (100nM -1 μ m) genellikle mikroveziküller olarak adlandırılır (Huatori & Helenius, 2011). Apoptoz sırasında oluşan veziküller ise apoptotik cisimler olarak bilinir ve göreceli olarak boyutları (1 μ m- 5 μ m) diğer EV’lerden büyüktür. Eksozomlar ise 40-120 nM arasında değişen boyutları ve son yıllarda yapılan araştırmalarla ortaya konan hücreler arası iletişimdeki özel rolleri ile EV’ler arasındaki rolünü belirginleştirmiştir (Zaborowski ve ark., 2015).

Hemen hemen bütün ökaryotik hücrelerden salınan eksozomlar, bir hücreden diğerine modülasyon sinyalleri gönderebilecek derecede hücreler arası iletişimde etkilidir. Böylece antijen sunumu, sinyal iletimi ve immün yanıtların düzenlenmesi gibi birçok hücrel organizasyonda önemli roller alırlar. Eksozomlar birçok vücut sıvısında bulunabilirler, kan, idrar, amniyotik sıvı, anne sütü ve tükürük gibi örneklerden eksozomlar izole edilmiştir (Keller ve ark., 2007; Machida ve ark., 2015;

Street ve ark., 2017). Eksozomların içerdiği kargolar, köken aldığı hücrenin doğasına göre ve hücrenin o anki durumuna göre (stres, stimülasyon, transformasyon) şekillenir. ASH kökenli eksozomlar CD54 (ICAM-1), CD80 ve CD86 gibi uyarıcı moleküller, bağırsak epitel hücresi (IEC) kökenli eksozomlar, bu hücrelere özgü belirteçler ve T hücresi kökenli eksozomlar CD3 içerirler (Clayton ve ark., 2001; Lamparski ve ark., 2002). Ayrıca eksozomlar taşıdıkları spesifik kargoların yanı sıra, yaygın bazı moleküllerde taşırlar. Endozomal kökenlerine bağlı olarak, endozomla ilişkili bazı proteinlerce (Rab GTPaz, SNAREs ve Annexin) zengin olan eksozomlar, ayrıca plazma membranında lokalize tetraspaninler (CD63, CD81, CD9) olarak bilinen protein ailesini de bolca barındırırlar (Bobrie ve ark., 2012). Tetraspanin proteinleri, hücre adhezyonu, aktivasyon ve antijen sunumunda görevleri olduğu düşünülen bu moleküllerin, MHC-II gibi bazı moleküllerle kompleks oluşturarak stabilizasyon sağladığına dair görüşler vardır (Saiz ve ark., 2018). Eksozomların ayrıca ısı şok proteinleri (HSP) ailesinin üyelerini içerdiği bulunmuştur (Şekil 6). Tetraspaninlerin yanı sıra endozom ilişkili proteinler ve bazı HSP'ler, eksozomlar için biyo-belirteç olarak önerilmiştir (Clayton ve ark., 2005).



Şekil 6. Eksozomların yapısına genel bakış

Bakteri veya viral kökenli enfeksiyonlarda eksozomların etkisi son yıllarda ilgi çekici bir çalışma sahası olmuştur. Gould ve arkadaşları retrovirüslerin eksozomları kullanarak, hücreleri enfekte etmede farklı yollar üretebildiği “truva eksozom” hipotezini ortaya atmıştır (Gould ve ark., 2003). Bu hipotez, HIV (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü)’in enfekte ettiği makrofajlardan kökenlenen eksozomların fenotipsel açıdan sağlıklı makrofaj kökenli eksozomlarla aynı molekülleri eksprese

ettiği bulunan bir çalışmayla desteklenmiştir. Bir başka çalışmada ise, tetraspaninler ve HIV ilişkili proteinlerin multivezikllerde bir arada olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur (Kramer ve ark., 2005; Nguyen ve ark., 2003). Enflamatuvar hastalıklarda eksozomların etkisi ve potansiyel rollerine dair bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır. Zhang ve arkadaşları, romatoid artrit hastalarında sinoviyal fibroblast kökenli eksozomların, köken aldığı hücreye sitotoksik etkileri bulunan TNF- α içerdiğini keşfetmiştir. Ayrıca romatoid artrit hastalarından izole edilen bazı eksozomların köken aldığı hücrelerin apoptoza dirençli olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2006). Sepsisli hastalarla ilgili yapılan bir diğer çalışmada, trombosit kökenli eksozomların sağlıklı kontrole göre daha fazla NADPH oksidaz aktivitesi gösterdiği bulunmuştur (Janiszewski ve ark., 2004).

Bruselloz ile eksozom çalışmalarına dair mevcut literatürde çalışma sayısı çok azdır. Yapılan bir çalışmada, birçok patojenik mikroorganizmanın enfeksiyonun yayılmasını inhibe eden anti-intrasellller patojen protein anti-interferon-endklenebilir-transmembran protein 3 (IFITM 3)'n *Brucella melitensis* ile enfekte makrofajlardan kökenlenen eksozomlarda varlığı tespit edilmiştir. IFITM 3 içeren eksozomların bir hücreden başka hücreye geçerek, enfeksiyonun engellenmesinde önemli katkıları bulunduğu düşünülmektedir (Yi ve ark., 2021). Her ne kadar diğer hücrelerden kökenlenen eksozomlara dair herhangi bir bulgu elde edilemese de, IFITM 3 içeren eksozom tedavisi açı geliştirmeleri için önemli görünmektedir. Bugüne dek *Brucella* enfeksiyonlarında birçok eksozomal proteinin izine rastlanmıştır (Kanehisa ve ark., 2021) (Tablo 4). Ancak bruselloz patogenezinde bu eksozomal kargoların etkisi aydınlatılamamıştır.

Tablo 4. *Brucella* enfeksiyonlarında en çok bulunan eksozomal proteinler

<i>Brucella melitensis</i>
<u>BMNI_11103</u> phosphopyruvate hydratase
<u>BMNI_11660</u> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<u>BMNI_11661</u> phosphoglycerate kinase
<u>BMNI_11678</u> pyruvate kinase
<u>BMNI_110608</u> dipeptidase
<i>Brucella abortus</i>
<u>DK48_981</u> eno; phosphopyruvate hydratase
<u>DK48_430</u> gap; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I
<u>DK48_429</u> phosphoglycerate kinase family protein
<u>DK48_410</u> pyk; pyruvate kinase
<u>DK48_2133</u> dipeptidase AC
<i>Brucella suis</i>
<u>BSVBI22_A1128</u> eno; phosphopyruvate hydratase
<u>BSVBI22_A1724</u> gap; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<u>BSVBI22_A1725</u> pgk; phosphoglycerate kinase
<u>BSVBI22_A1744</u> pyk; pyruvate kinase
<u>BSVBI22_B0647</u> renal dipeptidase family protei
<u>BSVBI22_A1128</u> eno; phosphopyruvate hydratase
<i>Brucella canis</i>
<u>DA85_08315</u> gapA; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<u>DA85_08320</u> pgk; phosphoglycerate kinase
<u>DA85_08405</u> pyruvate kinase

Brucella patogenezinde eksozomların pro-enflamatuvar veya anti-enflamatuvar rolleri belirsizliğini korumaktadır. Mevcut literatürde, bruzellozda eksozomların immünfenotiplendirmesine dair bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, akut, kronik bruselloz ve sağlıklı kontrollerden alınan serum örneklerinden elde edilen eksozomların AHÖ yardımıyla immünfenotiplemesini yapmak, brusellozun farklı süreçlerinde, eksozomların hangi hücre gruplarından köken aldığını belirlemek, brusellozun kronikleşmesinde eksozomların etkisini ortaya koymak, bruselloz immünpatogenezinde eksozomların potansiyel rollerine dair literature katkılar sunmak amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hastaların Seçimi ve Çalışma Planı

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (16.09.2020 Karar no: 2020-16/10) onayının alınmasıyla birlikte çalışma planlaması yapıldı. Ekim 2020 ve Şubat-2021 arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na başvuran 10 akut (6 erkek, 4 kadın), 10 kronik (6 kadın, 4 erkek) bruselloz hastası ve herhangi bir hastalığı olmayan 10 (6 erkek, 4 kadın) yetişkin sağlıklı kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya başışçı olarak katılan tüm hasta ve sağlıklı bireylere çalışma ile ilgili bilgiler verildi, hasta onamı alınan bireyler çalışmaya kabul edildi. Hastaların, ikametgâh ve iletişim bilgisi, yaşları, cinsiyetleri, meslek bilgileri, laboratuvar bulguları ve tıbbi geçmiş verileri kayıt altına alındı. Hastaların tanı ve sınıflandırması, standart tüp aglütinasyon testi, klinik semptomlar ve hastalık süresi dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Bruselloz tanıları konulurken, SAT'taki antikor titre değerleri ($\geq 1/160$) ve klinik semptomlar (ateş, eklem ve iskelet ağrıları, yorgunluk vb.) dikkate alındı. Bruselloz tanıları konulduktan sonra semptomların sürelerine göre akut (0-8 hafta) ve kronik (>1 yıl) bruselloz sınıflandırılması yapıldı.

18 yaş ve üzerinde klinik veya laboratuvar tanısı konmuş akut veya kronik bruselloza sahip, bruselloz dışında kronik granülomatoz hastalığı bulunmayan, herhangi bir enfeksiyöz hastalığı bulunmayan, kalp, karaciğer ve renal yetersizliği olmayan, otommün veya immün kökenli bir hastalığı bulunmayan, anemi veya lökopenisi olmayan neoplastik ve romatolojik hastalığı olmayan kişiler hasta grubunda çalışmaya dahil edildi. Sağlıklı gönüllüler ise, kan merkezine donör aday olarak başvuran, bilinen yada saptanan herhangi bir hastalığı bulunmayan, son 6 aydır ateşli enfeksiyon geçirmemiş bireylerden oluşmaktadır. Hasta ve sağlıklı gruplarında, demografik veriler göz önüne alınarak seçim yapılmıştır. Hasta grubunda rutin kontrolleri için yapılacak tetkiklerde kan alımı sırasında ve sağlıklı gönüllülerden ise kan vermek üzere gelen donörlerden kan alımı sırasında 10 ml kan örnekleri alındı. Hasta ve sağlıklı gönüllülerin serumları ayrıldıktan sonra çalışma başlangıcına kadar -20°C'de derin dondurucuda saklandı. Hastaların serum örneklerinden eksozomlar

ticari kit (NORGEN, Kanada) kullanılarak izole edildi. Eksozom miktarları Bikinkoninik Asit Yöntemi (Thermo, ABD) ile belirlendi. İzole edilen eksozomların boyutlarının AHÖ ile analizleri için boyutlarının küçük olması sebebiyle, anti-CD9 monoklonal antikolarla kaplanmış karboksilateks boncuklar (Life Technology, ABD) ile muamele edilerek, önceden dizayn edilen immün panele göre AHÖ cihazı (Navios, Beckman Coulter) ile analiz edildi.

3.2. Eksozom İzolasyonu

Tüm hasta ve sağlıklı gruplarından eksozom analizi ticari olarak satılan kit (NORGEN, Canada) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hasta ve sağlıklı gönüllülerden elde edilen serum örnekleri kullanıldı. Kiti üreten ticari firmanın önerdiği şekilde uygulanan protokol aşağıdaki gibidir.

- Serum örneklerinden 1'er ml, 15ml'lik falkon tüplerine aktarıldı
- Falkon tüplere, 3 ml nükleaz içermeyen steril distile su eklendi
- Sonrasında, 4 ml olan örnek tüplerine, 100 µl ExoC Buffer solüsyonu eklendi ve vortekslendi
- Tüplere, 200 µl SlurryE solüsyonundan eklendi ve vorteks tekrarlanarak 5-10 dakika oda ısısında bekletildi.
- Örnekler, 2000 RPM'de 2 dakika santrifüj edildi, süpernatant kısmı atıldı
- Tüplerin dibinde kalan Slurry pelletinin üzerine 200 ExoR buffer eklendi ve 10 dakika boyunca oda ısısında bekletildi
- İnkübasyonun ardından tüpler 500 RPM'da 2 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Süpernatant kısımları, filtreli mini spin kolon olan elüsyon tüplerine aktarıldı.
- Elüsyon tüpleri 1 dakika boyunca 6000 RPM'de santrifüj edildi.
- Kolondan geçen solüsyonlar saklanarak, pürifiye eksozomlar elde edildi.
- Çalışmanın bir sonraki aşamasına kadar -20°C'de muhafaza edildi.



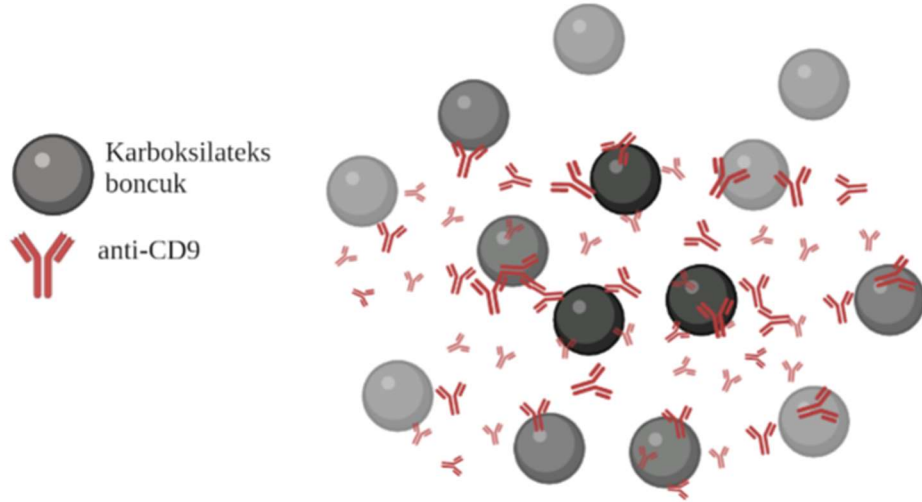
Şekil 7. Eksozom izolasyonu

3.3. Monoklonal CD9 Antikoru ile Karboksilateks Boncuk Konjugasyonu

Karboksilateks boncuklar, AHÖ analizlerinde sıklıkla kullanılır. Eksozomların küçük boyutları AHÖ analizi için sorun teşkil etmektedir. Bu sorunu gidermek amacıyla karboksilateks boncuklar kullanıldı. CD9 monoklonal antikoları ve karboksilateks boncuk konjugasyonu aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir.

- 1.5 ml eppendorf tübüne 20 µl boncuk (Carboxyl Latex, %4 w/v 3,5 m, Life Technology) ve 80 µl 1xPBS eklendi.
- 10 dakika 15000 RCF'de santrifüjden sonra süpernatant atıldı.
- Ardından 20 µg CD9 antikoru (Biolegend-mouse, ABD) eklendi ve 50 µl'lik hacim içinde resüspand edildi.
- Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve 500 µl 1xPBS eklenerek 10 saniye vortekslendi.
- Tüpler bir gece oda ısında rotatorda inkübe edildi.

- İnkübasyondan sonra 12000 RCF'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı.
- Tüplere, 1 ml %5 BSA eklendi, resüspand edildikten sonra 4 saat oda ısısında inkübe edildi.
- Tekrar santrifüj ve süpernatantın uzaklaştırılmasından sonra 50 µl %1 BSA ilave edilerek boncuk-anti-CD9 konjugasyonunun başarılı olup olmadığı eksozomlar ile inkübe edildikten sonra AHÖ'de değerlendirilerek doğrulandı.
- Elde edilen boncuk-anti-CD9 tüpleri +4°C'de saklandı.

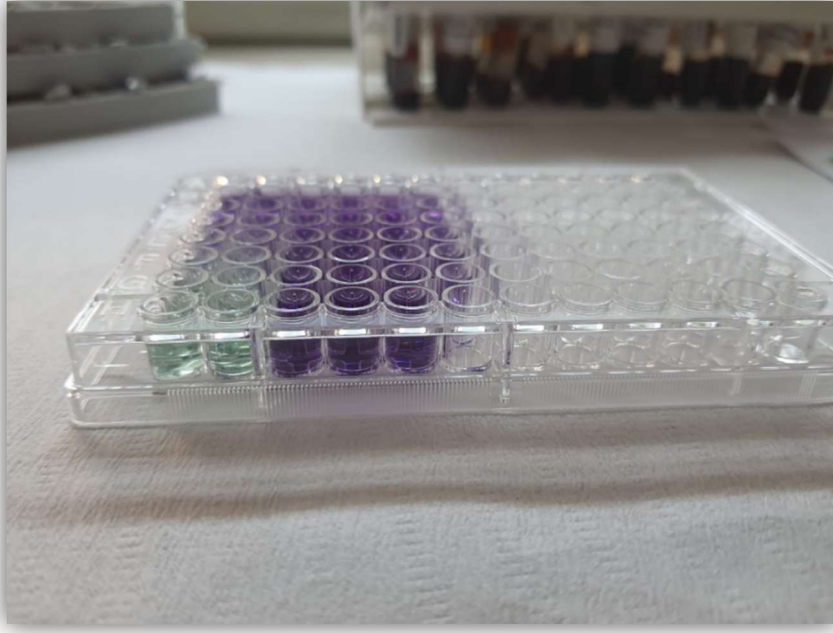


Şekil 8. anti-CD9- karboksilateks boncuk konjugasyonu

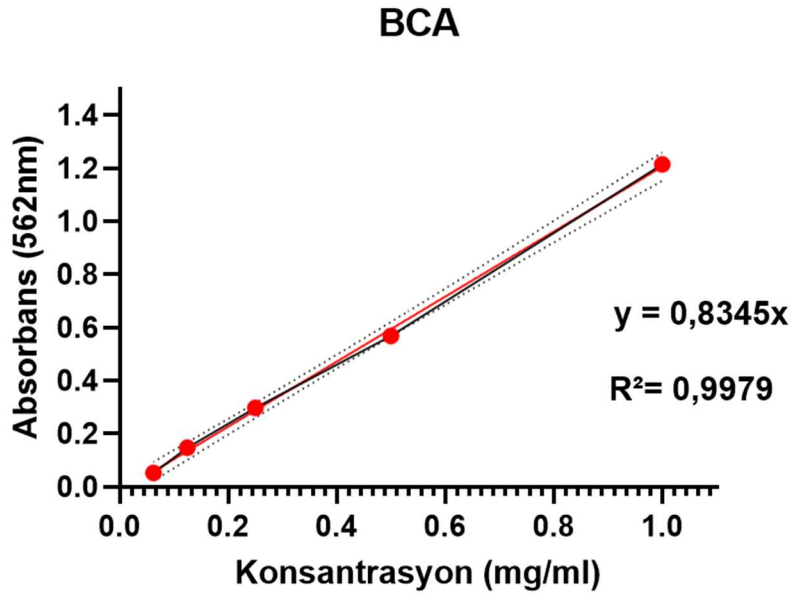
3.4. İzole Edilen Eksozom Miktarlarının Belirlenmesi

İzole edilen eksozomların miktarları, anti-CD9 kaplı boncuklarla bağlanması muamele öncesinde belirlenmelidir. Bu amaçla eksozom miktarlarının tayini için Bikinkoninik Asit Yöntemi (BCA) ticari bir kit kullanılarak (Thermo, ABD) gerçekleştirildi. Ticari firmanın önerdiği protokol aşağıdaki gibidir.

- İlk olarak, 15 ml'lik bir falkon tüpü içerisine BCA Reaktif A'dan 5 ml ve 100 µL BCA Reaktif B eklenerek, solüsyon yeşil renge kadar iyice karıştırıldı.
- Eksozom örnekleri konsantrasyonlarına göre 1x PBS ile 10 kat dilüe edilerek son hacmi 20 µl şekilde ayarlandı
- Kitin önerdiği şekilde hazırlanan standart konsantrasyonları ve ardından örnek konsantrasyonları kuyucuklara konuldu.
- 1. Kuyuya, 50 µl 1xPBS ve 50 µl (2 mg/ml) BSA standardı eklendi.
2. Kuyu için, 1. kuyudan 50 µl ile birlikte 50 µl 1xPBS eklendi.
3. Kuyu için, 2. kuyudan 50 µl ile birlikte 50 µl 1xPBS eklendi.
4. Kuyu için, 3. kuyudan 50 µl ile birlikte 50 µl 1xPBS eklendi.
5. Kuyu için, 4. kuyudan 50 µl ile birlikte 50 µl 1xPBS eklendi.
6. Kuyu için, 50 µl 1xPBS eklendi (Buffer Blank).
- Standart dilüsyon işlemleri duplike olarak çalışıldı. Mikroplakta iki sütun 6 kuyu standart örneklerinden oluşmaktadır.
- Standartların konulmasının ardından hasta eksozom örnekleri 20 µl olarak mikroplağa koyuldu.
- Standart ve örneklerin bulunduğu kuyulara başlangıçta hazırlanacak olan BCA Reagent A ve B karışımından oluşmuş yeşil renkli solüsyondan 150 µl ilave edilip pipet yardımıyla karıştırılır.
- Plak şeffaf yapışkan bir film ile kapatılarak 15 dakika 37°C'de su banyosu içerisinde inkübe edildi ve ardından 562 nm'de spektrofotometrede okutuldu.



Şekil 9. BCA yönteminde kullanılan mikropalak



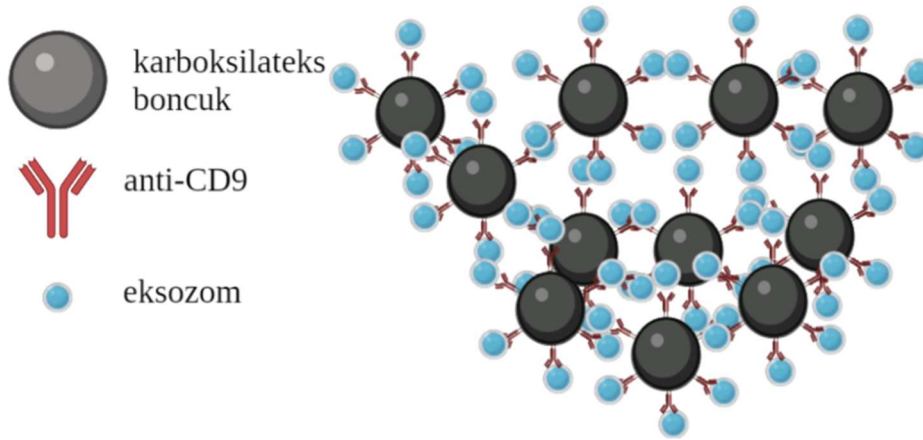
Şekil 10. Eksozom miktarlarının tayini için kullanılan absorbans-konsantrasyon grafiği

3.5. Eksozom ve anti-CD9 Kaplı Karboksilateks Boncuk Konjugasyonu

Daha önceden hazırlanan anti-CD9 kaplı karboksilateks solüsyonu ve eksozomların konjugasyonu için, dizayn edilen panelde kullanılacak tüp miktarı ve

BCA analizi sonucu tayin edilen eksozom miktarları bilinmelidir. Her bir analiz için, 1 µg eksozom örneği ve 1 µl karboksilateks boncuk birleşimi kullanıldı. Aşağıdaki protokole göre eksozom ve boncuk konjugasyonu gerçekleştirildi.

- Her bir analiz tüpü için, 1 µg eksozom örneği ve 1 µl karboksilateks boncuk ile birlikte 50 µl 1x PBS eklendi.
- Örnekler, 30 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi.
- İnkübasyonun sonunda, 1xPBS ile örnekler 500 µl'e tamamlandı.
- Eksozom ve boncuk solüsyonu bir gece boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında rotatorun üzerinde inkübe edildi
- Ertesi gün, 10000 RCF'de 5 dakika boyunca örnekler santrifüj edildi.
- Süpernatant kısımları atılıp, pellet kısımlarının üzerine 50 µl 1xPBS eklenerek, iyice karıştırılarak, AHÖ değerlendirmesi için hazır hale getirildi.



Şekil 11. Eksozom-boncuk konjugasyonu

3.6. Eksozom Varlığının Doğrulanması

3.6.1. Akan Hücre Ölçer ile Eksozom Varlığının Doğrulanması

Eksozomal membranlar, endozoma özgü tetraspaninler (CD9, CD63, CD81) bakımından oldukça zengindir. Bu bağlamda eksozomların varlığının doğrulanması amacıyla, AHÖ analizi için tasarlanan ve eksozom profillendirme panelinde bulunan

CD9 FITC monoklonal antikoruna ile doğrulamanın yanı sıra, en bilinen eksozomal belirteçlerden olan CD63 PE ve CD81 FITC monoklonal antikorları ile izole edilen eksozom örnekleri boyandı.

3.6.2. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Eksozom Varlığının Doğrulanması

Çalışma ile elde edilmesi plananan eksozomların varlığı taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) kullanılarak ve mevcut literatür verileri göz önünde bulundurularak analiz edildi. SEM analizi için Bursa Uludağ Üniversitesi SEM Laboratuvarında bulunan termiyonik elektron tabancası temelli bir cihaz olan ZEISS EVO 40 (Almanya) marka cihaz kullanıldı. Isıtılmış filamandan yayılan elektronların yardımıyla görüntü alımı sağlayan bu yöntemle eksozom varlığının doğrulanması amaçlandı.

- Eksozom içeren örnekler, alimünyum tablalara fikse edildi.
- Hazırlanan örneklerde, herhangi bir kontaminasyon olmaması amacıyla dikkatle kurutulmuştur.
- Yüzey kontrastı Baltec SCD006 model sputter-coater (Almanya) ile altın ve palladiumla kaplanarak artırıldı (%60 altın ve %40 paladyum).
- Okutma sırasında, kızılötesi kameradan yardım alınarak en uygun konformasyonel açı seçilmiştir.
- Örneklerden, yüksek basınç altında 10.000x ve 55.000x büyütmede görüntüler alınmıştır.

3.7. Akan Hücre Ölçer Değerlendirmesi

Çalışmada her hasta için 2'si izotipik kontrol olmak üzere toplam 6 adet tüp, AHÖ değerlendirmesi için kullanılmıştır. Eksozomların köken aldığı hücrelerin profilini yansıttığı bilinmektedir. Bu bağlamda çeşitli hücre ve hücre gruplarının değerlendirilmesi yapılmıştır. T lenfositler, Yardımcı T lenfositler (Thelper), sitotoksik T lenfositler, B lenfositler, NK hücreleri, NKT hücreleri, miyeloid kökenli

süpressör hücreleri (MDSC) değerlendirmek için monoklonal antikorlar aracılığı ile boyanan hücre yüzey molekülleri aşağıdaki gibidir:

T hücreler: CD9⁺CD3⁺

T helper hücreler: CD9⁺CD3⁺CD4⁺

Sitotoksik T hücreler: CD9⁺CD3⁺CD8⁺

B hücreler: CD9⁺ CD19⁺,

Doğal öldürücü (NK) hücreler ; CD9⁺CD3⁻CD56⁺

Doğal öldürücü T hücreler (NKT) : CD9⁺CD3⁺CD56⁺

Eritrositler: CD9⁺GLY-A⁺ (CD235a⁺)

Eozinofiller : CD9⁺ CD23⁺

Monositler: CD9⁺ CD14⁺

Trombositler: CD9⁺ CD41⁺

Granülositler: CD9⁺CD15⁺

MDSC'ler: CD9⁺ CD3⁻CD19⁻CD33⁺ CD11b⁺ HLA-DR⁻

Monosit kökenli MDSC'ler: CD9⁺ CD3⁻CD19⁻ CD33⁺CD11b⁺HLA-DR⁻CD15⁻CD14⁺

Granülosit kökenli MDSC'ler: CD9⁺CD3⁻CD19⁻CD33⁺CD11b⁺HLA-DR⁻

CD15⁺CD14⁻

Kullanılan Monoklonal Antikorlar

CD9 FITC, **GLY A (CD235a)** PE, **CD3** ECD, **CD56** PC5.5, **CD8** PC7, **CD4** APC, **CD41** PE, **CD19** PC7, **CD23** APC, **CD81** FITC, **CD63** PE, **CD33** PE, **CD3 CD19** ECD, **CD15** PC5, **CD11b** PC7, **CD14** APC, **HLA-DR** PB.

Tablo 5. AHÖ eksozom değerlendirmesinde kullanılan monoklonal antikorlar

Exo Panel 1						
	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC
Kontrol Tüpi						
1.TÜP	<i>CD9</i>	<i>GLYA</i>	<i>CD3</i>	<i>CD56</i>	<i>CD8</i>	<i>CD4</i>

Exo Panel 2				
	FITC	PE	PC7	APC
Kontrol Tüpi				
1. TÜP	<i>CD9</i>	<i>CD41</i>	<i>CD19</i>	<i>CD23</i>
2.TÜP	<i>CD81</i>	<i>CD63</i>		

Exo Panel 3							
	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	PB
Kontrol Tüpi							
1.TÜP	<i>CD9</i>	<i>CD33</i>	<i>CD3</i> <i>CD19</i>	<i>CD15</i>	<i>CD11b</i>	<i>CD14</i>	<i>HLA-DR</i>

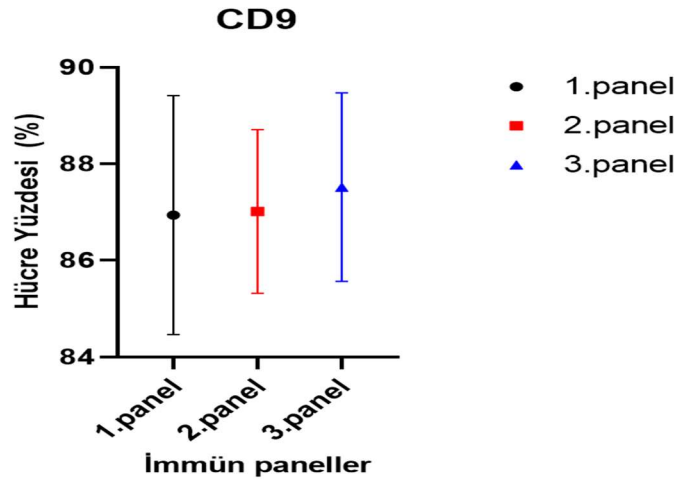
3.8. İstatiksel Değerlendirme

Çalışmamızdaki tüm istatiksel analizler SPSS v.21 (Chicago, IL, ABD) paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz sonucuna göre gruplar arası elde edilen değerlerin normallik durumu incelendi. Normallik analizi Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri ve histogram incelemeleri ile yapıldı. Normal dağılıma uyan değişkenler ortalama ve standart sapma ile ifade edilirken, normal dağılıma uymayan değişkenler medyan ve minimum-maksimum değerleriyle gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan verilerin incelenmesinde gruplar arası varyansların homojenliği Levene testi kullanılarak analiz edilmiştir. Normal dağılım gösteren değişkenlerin gruplar arası incelemelerinde ikili karşılaştırmalar bağımsız örneklem T testi, normal dağılıma uymayan değişkenlerin gruplar arası incelemesinde ise Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve Bonferoni düzeltilmesi uygulandı. Normal dağılım gösteren sayısal grupların karşılaştırması ise tek yönlü ANOVA testi kullanılarak, normal dağılım göstermeyenlerde ise Kruskal-Wallis testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4-BULGULAR

Brusellozlu hastalardan 10 akut ve 10 kronik olmak üzere toplam 20 kişi ve sağlıklı kontrol grubunda ise 10 kişi ile yürütülen çalışmada, eksozomlar izole edilip, varlığı farklı yöntemlerle doğrulandıktan sonra AHÖ değerlendirmeleri yapılmıştır. AHÖ değerlendirmelerinde 3 farklı immün panel kullanılmıştır.

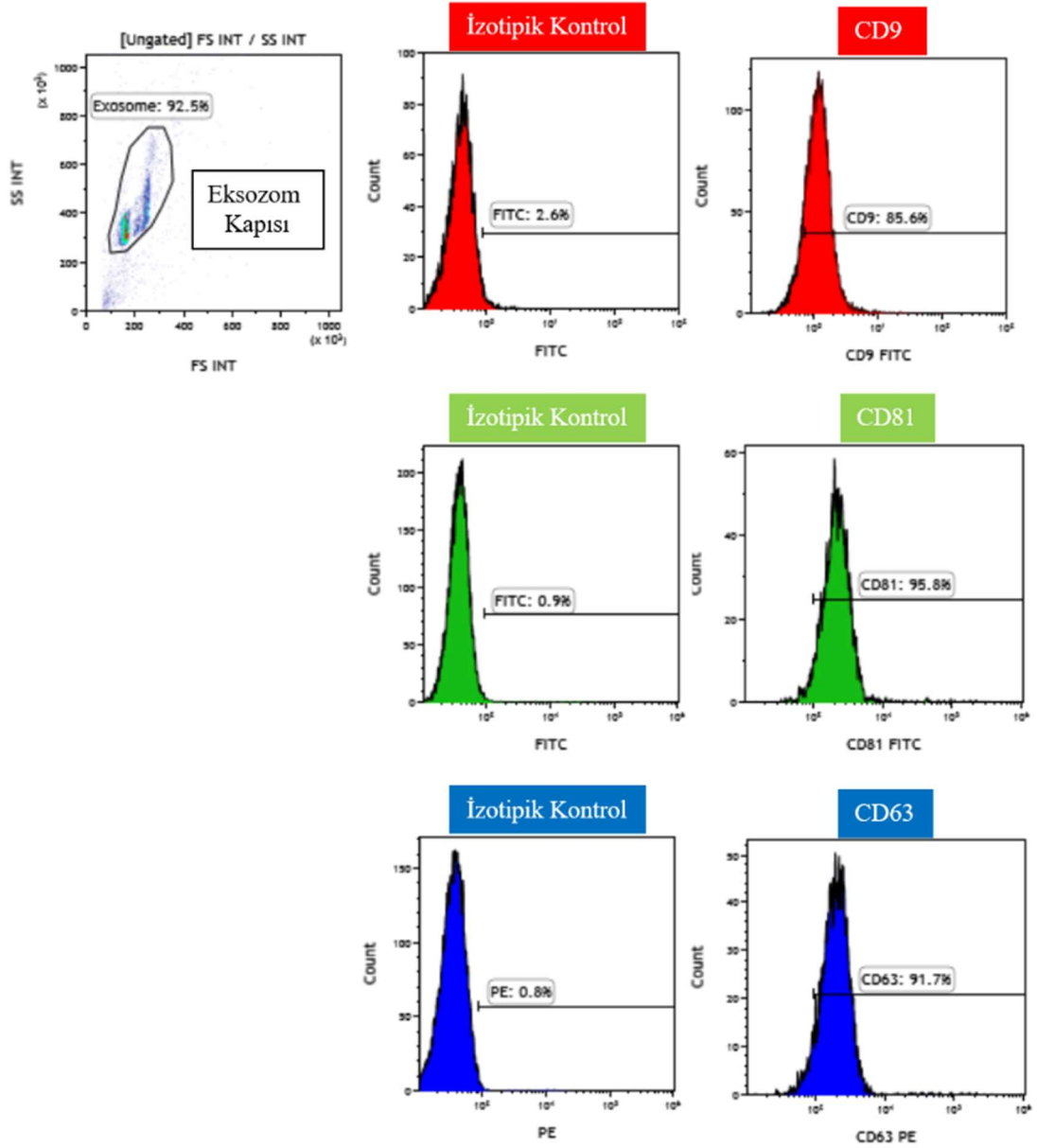
T hücre, Yardımcı T hücre, Sitotoksik T hücre, eritrosit, NK hücre ve NKT hücre belirteçleri panel-1’de yer almıştır. Panel-2’de ise B lenfosit, eozinofil ve trombosit belirteçleri bulunmaktadır. Monositler, granülositler ve MDSC belirteçleri ise panel-3’te analiz edilmiştir. Eksozomal bir belirteç olan endozoma özgü tetraspaninlerden CD9, her üç panelde de değerlendirilmiştir. Ayrıca diğer tetraspaninler olan CD63 ve CD81 belirteçleri panel-2’de çalışılmıştır. Her üç panelde analiz edilen CD9’un ortalama değerleri Şekil 12’de gösterilmiştir.



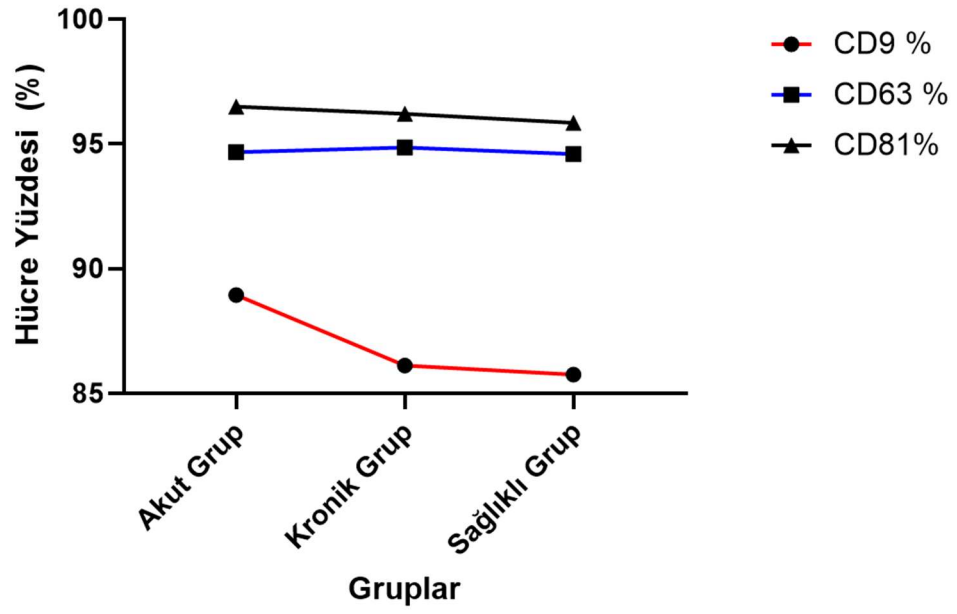
Şekil 12. Her üç panelde de çalışılan CD9’un ortalama değerleri(%).

4.1. Eksozom Varlığının Doğrulanması

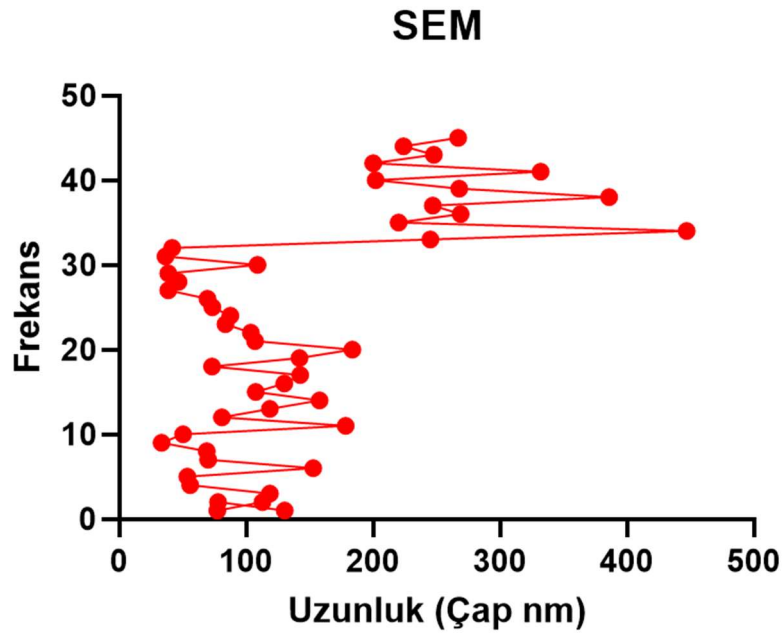
İzole edilen eksozomlarda, eksozomların yaygın belirteçleri olan tetraspaninler AHÖ kullanılarak değerlendirildi. CD9, C63 ve CD81 kullanılarak, yapılan değerlendirmede eksozom varlığı doğrulandı (Şekil 13-14). Ayrıca eksozom varlığının ortaya konmasında bir başka yöntem olan SEM değerlendirmeleriyle, akut ve kronik brusellozlu hastalardan izole edilen eksozomlar gösterilmiştir (Şekil 15-16).



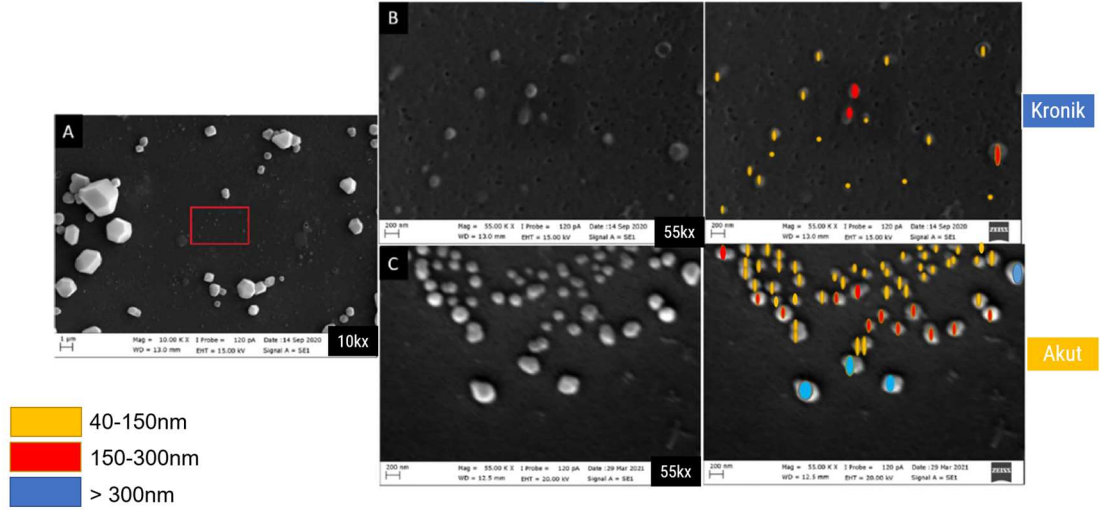
Şekil 13. CD9, CD81 ve CD63 boyaması sonucu AHÖ değerlendirmesi



Şekil 14. Hasta gruplarında eksozom belirteçleri olan tetraspaninlerin (CD9, CD63, CD81) ortalamaları



Şekil 15. Eksozom örneklerinin SEM incelemesi sonucu oluşturulan çap-frekans grafiği



Şekil 16. A. Eksozom SEM görüntüsü (10.000x), B. Eksozom SEM görüntüsü kronik bruselloz (55.000x), C. Eksozom SEM görüntüsü akut bruselloz (55.000x) (40-150nm arası sarı renk ile 150-300 nm arası kırmızı renk ile 300nm'den büyük veziküller ise mavi renk ile gösterilmiştir)

4.2. Akan Hücre Ölçer Değerlendirmeleri

Akut ve kronik brusellozlu hastaların ve sağlıklı kontrol grubunun AHÖ değerlendirmelerinde, eksozomların köken aldığı hücre gruplarının belirteçlerine göre elde edilen tanımlayıcı istatistik verileri (ortalama ve medyan değerleri) Tablo 6, 7 ve 8'de belirtilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, her üç çalışma grubu arasındaki en belirgin farklılıkların panel-3'te yer aldığı gözlenmiştir. Panel-3'te değerlendirilen MDSC- kökenli eksozomların AHÖ kapılama stratejisi Şekil 17'de gösterilmiştir.

Tablo 6. Panel-1’de değerlendirilen eksozomların tanımlayıcı istatistik verileri (%)

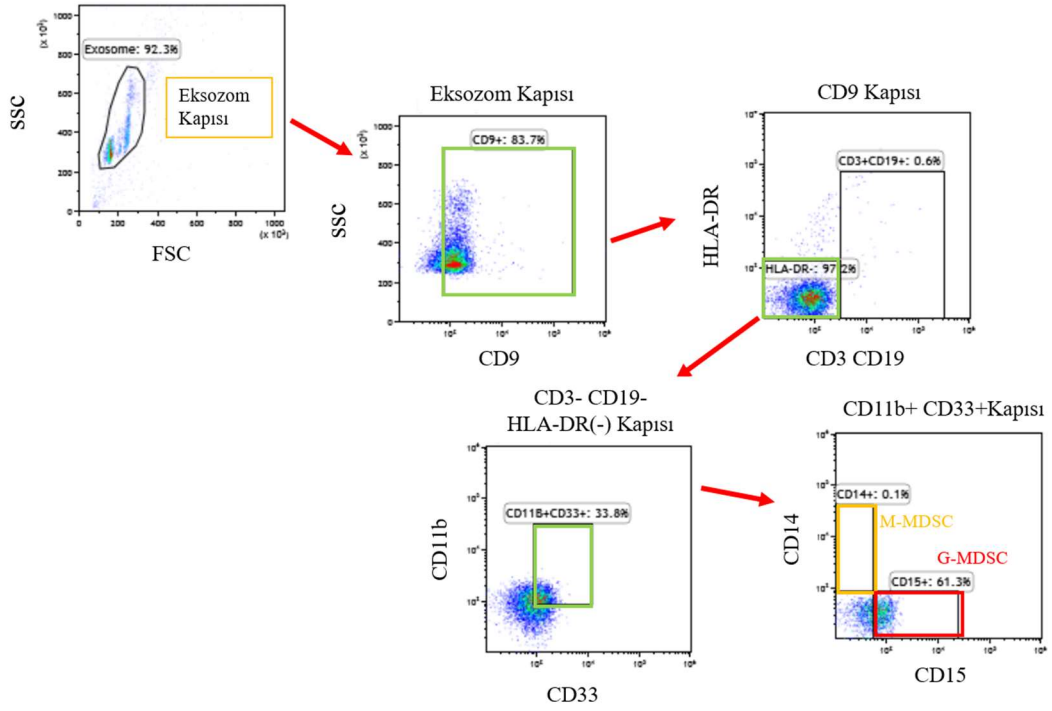
1. PANEL				
CD9 KAPISI %		Akut Bruselloz	Kronik Bruselloz	Sağhkh Kontrol
CD9+	ORTALAMA	88,94	86,12	85,75
	STD.HATA	1,10	1,02	1,88
	MEDYAN	89,15	86,70	83,25
	MİN-MAKS	(83,10-94,50)	(81,70-92,5)	(80,50-99,8)
CD3+	ORTALAMA	2,96	2,81	4,31
	STD.HATA	0,63	0,46	0,65
	MEDYAN	2,45	2,80	4,0
	MİN-MAKS	(1,0-6,70)	(0,80-5,10)	(2,1-9,0)
CD4+	ORTALAMA	1,0	1,14	1,48
	STD.HATA	0,20	0,23	0,32
	MEDYAN	0,90	0,80	1,25
	MİN-MAKS	(0,10-2,0)	(0,30-2,20)	(0,50-4,10)
CD8+	ORTALAMA	1,61	1,62	2,57
	STD.HATA	0,49	0,33	0,38
	MEDYAN	1,25	1,35	2,65
	MİN-MAKS	(0,10-3,80)	(0,10-3,70)	(1,20-5,40)
CD56+	ORTALAMA	1,66	0,97	1,15
	STD.HATA	0,35	0,20	0,36
	MEDYAN	1,35	0,75	0,80
	MİN-MAKS	(0,40-3,80)	(0,50-2,00)	(0,60-2,50)
GLYA+	ORTALAMA	1,83	1,45	1,54
	STD.HATA	0,36	0,24	0,18
	MEDYAN	1,60	1,10	1,20
	MİN-MAKS	(0,60-3,90)	(0,80-2,80)	(0,80-3,10)
CD3+CD4 +	ORTALAMA	0,34	0,23	0,37
	STD.HATA	0,18	0,09	0,14
	MEDYAN	0,10	0,10	0,15
	MİN-MAKS	(0-1,70)	(0-0,70)	(0-1,30)
CD3+CD8+	ORTALAMA	1,11	0,72	0,88
	STD.HATA	0,39	0,12	0,13
	MEDYAN	0,70	0,75	0,75
	MİN-MAKS	(0-3,10)	(0-1,40)	(0,50-1,70)
CD3+ CD56+	ORTALAMA	1,30	0,78	0,79
	STD.HATA	0,32	0,12	0,13
	MEDYAN	0,85	0,60	0,65
	MİN-MAKS	(0,30-3,10)	(0,30-1,30)	(0,20-2,0)
CD3- CD56+	ORTALAMA	0,26	0,12	0,39
	STD.HATA	0,13	0,02	0,11
	MEDYAN	0,15	0,10	0,30
	MİN-MAKS	(0-1,40)	(0-0,30)	(0,10-1,40)

Tablo 7. Panel-2’de değeriendirilen eksozomların tanımlayıcı istatistik verileri (%)

2.PANEL				
1.TÜP (CD9 KAPISI %)		Akut Bruselloz	Kronik Bruselloz	Sağlıklı Kontrol
CD9+	ORTALAMA	90,90	86,02	85,63
	STD. HATA	1,06	1,14	1,00
	MEDYAN	91,05	85,30	84,50
	MİN-MAKS	(86,70-97,10)	(81,10-92,70)	(82,70-91,40)
CD41+	ORTALAMA	1,45	0,95	1,37
	STD. HATA	0,28	0,12	0,20
	MEDYAN	1,50	0,85	1,10
	MİN-MAKS	(0,30-2,90)	(0,40-1,80)	(0,90-2,90)
CD19+	ORTALAMA	1,21	2,20	2,36
	STD. HATA	0,31	0,80	0,50
	MEDYAN	1,10	1,10	1,90
	MİN-MAKS	(0-2,90)	(0,30-8,70)	(0,70-5,80)
CD23+	ORTALAMA	1,23	1,70	1,63
	STD. HATA	0,28	0,61	0,38
	MEDYAN	0,90	0,80	1,25
	MİN-MAKS	(0,20-3,00)	(0,40-6,60)	(0,50-3,90)
2.TÜP (%)		Akut Bruselloz	Kronik Bruselloz	Sağlıklı Kontrol
CD63+	ORTALAMA	94,67	94,86	94,60
	STD.HATA	0,56	0,56	0,65
	MEDYAN	94,90	95,15	94,40
	MİN-MAKS	(92,00-97,60)	(90,40-97,10)	(90,80-96,80)
CD81+	ORTALAMA	96,49	96,20	95,84
	STD.HATA	0,47	0,63	0,76
	MEDYAN	96,55	96,40	95,45
	MİN-MAKS	(93,70-98,80)	(91,70-98,90)	(91,80-99,00)

Tablo 8. Panel-3’de değerdendirilen eksozomların tanımlayıcı istatistik verileri (%)

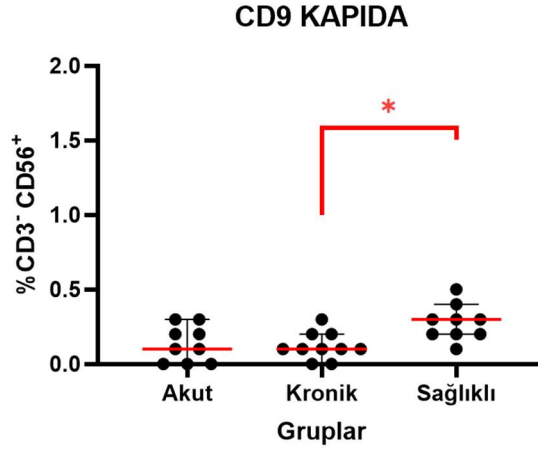
3.PANEL				
CD9 KAPISI %		Akut Bruselloz	Kronik Bruselloz	Sağlıklı Kontrol
CD9+	ORTALAMA	90,50	85,81	84,73
	STD.HATA	1,16	0,89	1,36
	MEDYAN	91,40	85,50	84,46
	MİN-MAKS	(84,60-96,50)	(80,90-90,40)	(80,60-93,70)
CD11b+	ORTALAMA	46,65	12,50	8,64
	STD.HATA	4,87	1,10	0,78
	MEDYAN	48,45	11,75	8,0
	MİN-MAKS	(17,20-72,0)	(8,70-18,70)	(6,0-14,20)
HLA-DR+	ORTALAMA	3,86	0,94	1,44
	STD.HATA	1,12	0,11	0,30
	MEDYAN	2,50	0,92	1,15
	MİN-MAKS	(0,80-10,60)	(0,50-1,60)	(0,50-3,40)
CD14 +	ORTALAMA	5,05	1,21	1,83
	STD.HATA	1,79	0,30	0,39
	MEDYAN	2,40	0,95	1,45
	MİN-MAKS	(0,40-14,70)	(0,40-3,50)	(0,40-4,10)
CD15 +	ORTALAMA	58,70	14,83	11,83
	STD.HATA	5,49	1,05	1,19
	MEDYAN	60,45	14,25	10,65
	MİN-MAKS	(34,10-83,10)	(10,30-20,90)	(8,90-19,00)
CD11b+ HLA-DR-	ORTALAMA	44,93	11,99	8,01
	STD.HATA	5,14	1,06	0,89
	MEDYAN	47,10	12,15	7,25
	MİN-MAKS	(15,50-70,0)	(8,0-17,20)	(4,80-14,50)
CD11b+ HLA-DR- KAPIDA CD15-CD14+	ORTALAMA	0,65	0,05	0,08
	STD.HATA	0,27	0,02	0,03
	MEDYAN	0,85	0,01	0,05
	MİN-MAKS	(0-2,10)	(0-0,20)	(0-0,4)
CD11b+ HLA-DR- KAPIDA CD15+ CD14-	ORTALAMA	29,57	2,15	1,73
	STD.HATA	5,03	0,23	0,25
	MEDYAN	31,9	2,15	1,50
	MİN-MAKS	(5,90-50,10)	(1,20-3,50)	(0,90-3,20)
CD33 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁻ CD11b ⁺ HLA-DR ⁻ KAPIDA CD15 ⁺ CD14 ⁺	ORTALAMA	54,35	16,04	10,4
	STD.HATA	4,25	0,58	2,10
	MEDYAN	58,90	16,85	12,05
	MİN-MAKS	(33,80-69,50)	(13,40-18,00)	(0-22,90)
CD33 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁻ CD11b ⁺ HLA-DR ⁻ KAPIDA CD15 ⁻ CD14 ⁺	ORTALAMA	0,15	0,66	0,12
	STD.HATA	0,08	0,48	0,12
	MEDYAN	0,01	0,01	0
	MİN-MAKS	(0-0,90)	(0-4,90)	(0-1,20)



Şekil 17. MDSC-kökenli eksozom analizi için kullanılan AHÖ kapılama stratejisi

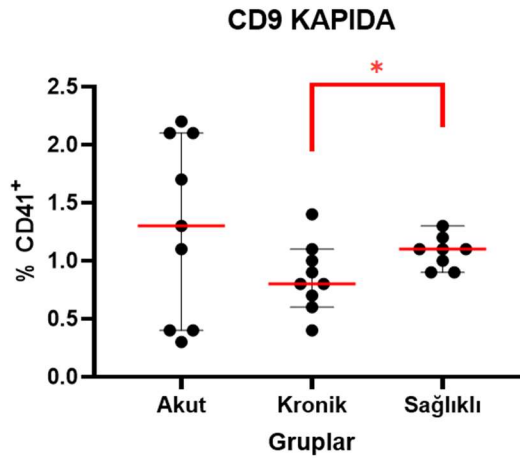
4.3. Hücre Düzeylerinin Karşılaştırılması

Çalışmamızda izole edilen eksozomların köken aldığı hücre grupları üç panelde incelenmiştir. Panel-1’de belirtilen hücre gruplarından köken alan eksozomların gruplar arası karşılaştırılması sonucu yalnızca NK ($CD9^+CD3^-CD56^+$) hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kronik brusellozlu kişilerde NK hücrelerinden kökenlenen eksozomların sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı bulundu ($p=0.007$) (Şekil 18). Ayrıca $CD8^+$ ve $HLA-DR^+$ eksprese eden eksozomlar, akut ve kronik gruplarında sağlıklı kontrole azalma eğilimi gösterse de istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.



Şekil 18. NK hücre-kökenli eksozomların gruplar arası değerlendirilmesi (*: $p < 0.05$).

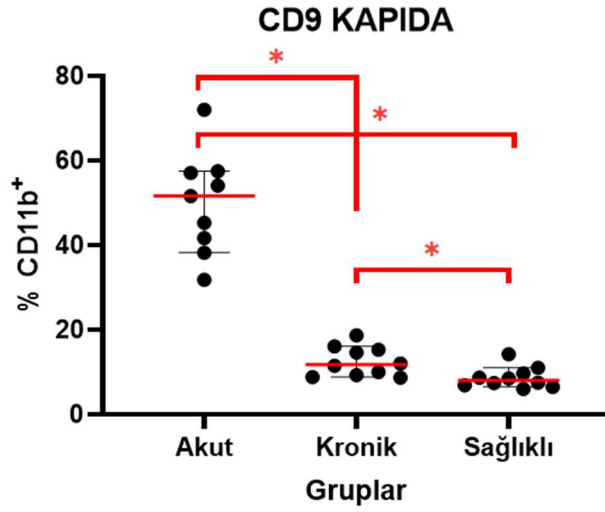
Panel-2’de değerlendirilen B hücre ve eozinofil-kökenli eksozomlar incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Trombosit-kökenli eksozom değerleri ise, kronik bruselloz grubunda sağlıklı kontrole göre anlamlı derecede düşük izlendi ($p = 0.048$) (Şekil 19).



Şekil 19. Trombosit-kökenli eksozomların gruplar arası değerlendirilmesi (*: $p < 0.05$).

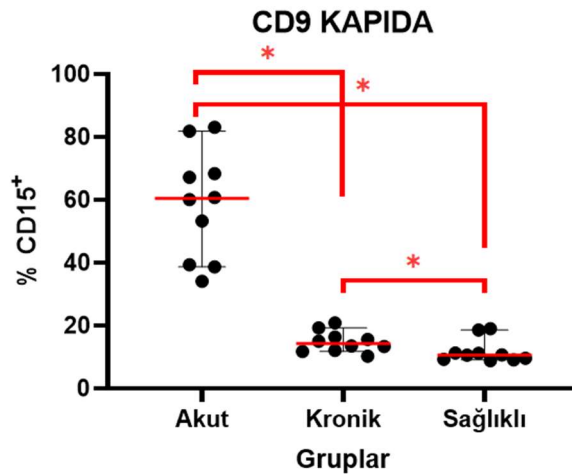
Çalışmadaki en anlamlı sonuçlar panel-3’de yer alan hücrelerden kökenlenen eksozom değerlerinde bulunmuştur. CD11b⁺ eksozomların, akut bruselloz grubunda kronik bruselloz ve sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi (akut-kronik : $p < 0.01$, akut-sağlıklı: $p < 0.01$). Aynı şekilde bu eksozomlar kronik

bruselloz grubunda da sağlıklı kontrol grubuna göre artmış bulundu ($p=0.011$) (Şekil 20).



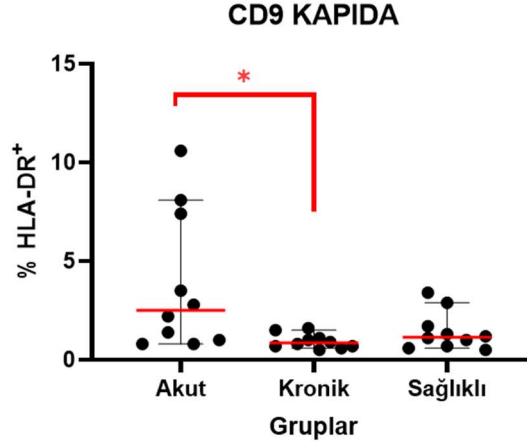
Şekil 20. CD11b⁺ eksozomların gruplar arası değerlendirilmesi (*: $p<0.05$).

Granülosit-kökenli eksozomlar (CD9⁺ CD15⁺) akut bruselloz grubunda hem kronik bruselloz grubuna göre hem de sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (akut-kronik: $p<0.01$, akut-sağlıklı: $p<0.01$). CD11b⁺ eksozomlar ile benzer bir profil çizen bu eksozomlar, kronik grubunda da sağlıklı kontrole göre anlamlı derecede artmış bulundu ($p=0.023$) (Şekil 21).



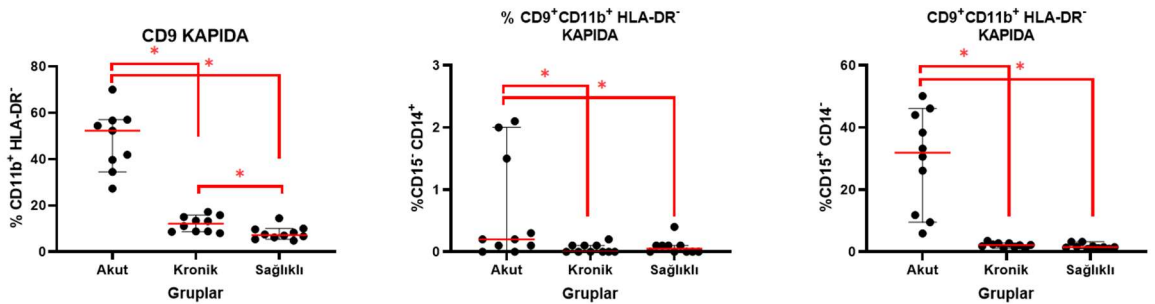
Şekil 21. Granülosit-kökenli eksozomların gruplar arası değerlendirilmesi (*: $p<0.05$).

HLA-DR eksprese eden eksozomlar incelendiğinde ise, akut bruselloz grubunda, kronik bruselloza göre anlamlı bir artış izlendi ($p=0.011$) (Şekil 22).



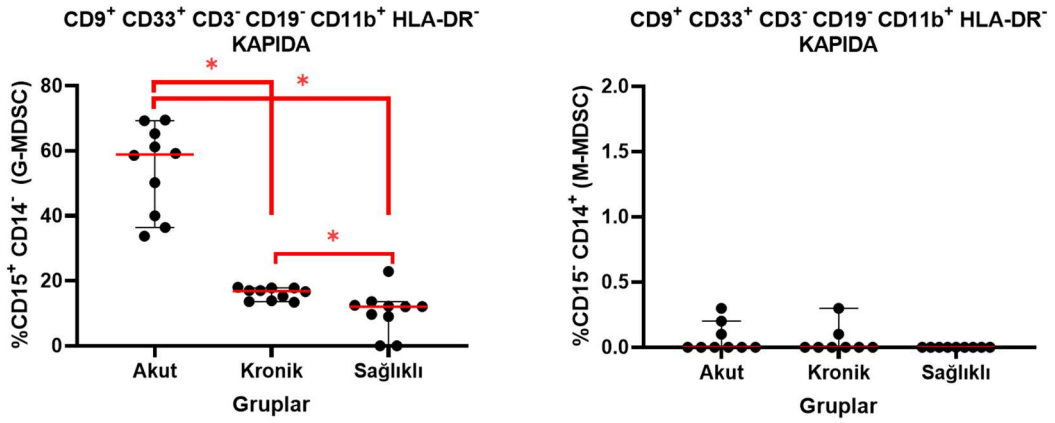
Şekil 22. HLA-DR⁺ eksozomların gruplar arası değerlendirilmesi (*: $p<0.05$).

HLA-DR sergilemeyen CD11b⁺ miyeloid kökenli hücrelerden kaynaklanan eksozomlar incelendiğinde, her üç grupta birbirinden anlamlı derecede farklı bir profil gözlemlendi. Akut bruselloz grubunda bu eksozomlar, kronik bruselloz ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış gözlemlendi, aynı zamanda bu eksozomlar kronik bruselloz grubunda da sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (akut-kronik: $p<0.01$, akut-sağlıklı: $p<0.01$, kronik-sağlıklı: $p=0.011$). HLA-DR⁻ CD11b⁺ eksozomlar, CD14 ve CD15 ekspresyonlarına göre incelendiğinde ise, CD14 sergileyen monositik-kökenli ve CD15 sergileyen granülositik kökenli eksozomlar akut bruselloz grubunda hem kronik bruselloz hem de sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (CD14⁺, akut-kronik: $p=0.018$, akut-sağlıklı: $p=0.42$) (CD15⁺, akut-kronik: $p<0.01$, akut-sağlıklı: $p<0.01$) (Şekil 23).



Şekil 23. Miyeloid kökenli hücrelerden kaynaklanan eksozomların gruplar arası değerlendirilmesi(*: $p<0.05$).

Diğer bulgularla uyumlu şekilde, granülositik kökenli-MDSC (G-MDSC)'lerden kaynaklanan eksozomlar ($CD9^+CD3^-CD19^-CD33^+CD11b^+HLA-DR^-CD15^+CD14^-$) her üç grupta istatikselsel olarak anlamlı biçimde birbirinden farklı bulunmuştur. G-MDSC-kökenli eksozomlar, akut bruselloz grubunda, kronik gruba göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.01$). Benzer şekilde bu eksozomlar, her iki hasta grubunda (akut ve kronik), sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış izlendi (akut-sağlıklı: $p<0.01$, kronik-sağlıklı: $p=0.019$) (Şekil-24).



Şekil 24. G-MDSC ve M-MDSC-kökenli eksozomların gruplar arası değerlendirilmesi (*: $p<0.05$).

5- TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsanları ve hayvanları uzun süredir etkileyen bruselloz, bulaşıcı bakteriyel bir hastalıktır. Hastalığa neden olan *Brucella* bakterilerinin bugüne kadar 12 adet farklı türü keşfedilmiştir. 1887 yılında ilk kez David Bruce tarafından izole edilen bu patojenler, konak çeşitliliği, karakteristik özellikleri ve gelişmekte olan ülkelere olan ekonomik zararları sebebiyle birçok çalışmaya konu olmuştur. Gelişmiş sağlık, hayvancılık ve tarım politikaları sayesinde birçok ülkede bruselloz vakaları yok denecek kadar azdır. Ancak gelişmekte olan ülkelerde bruselloz etkisini koruyarak, toplumsal bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Hastalığın hiper-endemik olarak kabul edildiği bölgelerden olan Akdeniz Havzası'nda Türkiye'nin de dahil olduğu yaklaşık olarak 20 ülke bulunmaktadır. Türkiye'de bildirilen bruselloz vakaları 2008'den 2015'e kadar azalma eğilimi göstermiş ancak 2016 yılından itibaren artışa geçmiştir (THSK, 2017). Ülkemizde, yetkili birimlere bildirilmesi zorunlu olan hastalıklardan olan brusellozdaki vaka sayılarının tahmin edilenden çok daha fazla olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda brusellozun klinik tablosu birçok açıdan değişkenlik gösterebilir. Ateş, kas ve iskelet ağrısı, yorgunluk gibi diğer hastalıklar ile tanısal açıdan benzerlik gösterebilecek semptomlara sahiptir. Hastalığın tanısı, klinik semptomların yanında serolojik ve moleküler yöntemlerle desteklenerek konulmalıdır. Bruselloz öldürücülüğü düşük ve tedavi edilebilen bir hastalıktır. Hastalığa karşı kombine antibiyotik tedavileri, *Brucella* bakterilerinin gün geçtikçe belirginleşen karakteristik özellikleri göz önüne alınarak hazırlanmaktadır. Bu durum hastalığın birçok ülkede ortadan kaldırılmasında en etkili faktörlerden birisidir.

EV'ler, prokaryotlar ve ökaryotlarda neredeyse her hücreden salgılanabilirler. EV'lere dair ilk incelemelerde, hücrelerin dış membranından kopan ve çoğunlukla hücre hasarı ve apoptoz sırasında salgılanan küçük kesecikler olarak tanımlanmıştır (Bobrie, Colombo, Raposo, & Thery, 2011). Son on yılda yapılan çalışmalar, EV'lerin hücreler arası iletişim ve sinyal iletiminde etkili rolleri olduğunu ortaya koymuştur. Daha önce bahsedildiği gibi EV'ler, eksozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimler olmak üzere genellikle üç alt gruba ayrılırlar. Mikroveziküller, yapısal olarak eksozomlara benzese de boyut ve içerik bakımından ayrılırlar. Apoptotik cisimler ise, ölmekte olan hücrelerden salgılanan, boyut olarak diğer EV'lerden büyük ve içerik

olarak genellikle eksozomlar ve mikroveziküller gibi sadece zararsız moleküller taşımayan veziküllerdir. EV'lerin en küçük alt grubunu oluşturan eksozomların ilk keşfinden itibaren yaklaşık 40 yıl geçmesine rağmen fizyolojik özellikleri tam olarak aydınlatılamamıştır. Eksozomların, antijen sunumu, hücre-hücre etkileşimleri, sinyal iletimi, hücreler arası molekül transferleri ve immün yanıtta önemli fonksiyonları olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında, patojen ve tümör kaynaklı eksozomların da immün sistemi modüle edebildiği bilinmektedir (Thery, 2011).

Eksozomların en ilgi çekici özelliklerinden biri de biyobelirteç olma potansiyelleridir. Eksozomlar, köken aldıkları hücrelerin özelliklerini yansıttıklarından, eksozomal fenotipin ve içeriğin kanser, otoimmün hastalıklar, enfeksiyon hastalıkları gibi birçok hastalığın erken tanısında ve takibinde gelecek vadettiği açıktır (Miao, Wang, Zhou, & Huang, 2021). Bugüne kadar birçok hastalıkta eksozomların rollerine dair çeşitli bulgular elde edilmesine rağmen bruselloz ile enfekte olan bireylerde immün yanıtta hücrelerden kökenlenen eksozomların profiline dair bir çalışma bulunmamaktadır. Bu doğrultuda araştırmamızda, brusellozlu hastaların eksozom profili ortaya konularak hastalığın tanı, tedavi ve takibine yeni bakış açıları kazandırmanın yanı sıra brusellozun farklı evrelerinde eksozomların muhtemel rollerine dair mevcut literatüre yeni kanıtlar sunmak amaçlanmıştır.

Bugüne kadar birçok bakteriyel enfeksiyonda eksozomların potansiyel rollerine dair çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Birden fazla çalışmada, konak hücrenin makrofajlarında lokalize hücre içi bir bakteri olan *Mycobacterium tuberculosis* bakterilerinin eksozom profili araştırılmıştır. Bir çalışmada bu bakterilerle enfekte makrofaj ve nötrofillerden salgılanan eksozomların, IL-12 ve TNF- α salınımını teşvik ettiği bulunmuştur (Singh, Smith, Karakousis, & Schorey, 2012). Ancak bir diğer çalışmada ise, konak hücre kökenli eksozomların bakteriyel bir ürün olan glikopeptidolipid (GPL) içerdiği keşfedilmiştir. Çalışmada, bu GPL'lerin konak hücrelere etkileştiği ve bakteri yararına immün yanıtı düzenleyebildiği gösterilmiştir (Bhatnagar, & Schorey, 2007). Aynı bakteriler üzerine yapılan bir başka çalışmada ise, bakteriyel ürünler taşıyan konak hücre kökenli eksozomların başka hücrelerle etkileşime geçtiği ve pro-enflamatuvar yanıtı tetiklediği gösterilmiştir (Singh, LeMaire, Tan, Zeng, & Schorey, 2011). Bu eksozomların içerik olarak, mikobakteri

kaynaklı lipid, karbonhidrat ve proteince zengin olduğundan, PAMP-benzeri reseptörlere bağlanması yoluyla pro-enflamatuvar etkileri tetiklediği düşünülmektedir. Bir başka çalışmada ise, mikobakteriyel kökenli mikozidlerin ve diğer ürünlerin eksozomlar yoluyla, enfekte olmayan makrofajlara ulaştırıldığı bulgusuna ulaşılmıştır (Beatty ve ark., 2000). Ayrıca *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte hücrelerden izole edilen eksozomların enfekte olmamış immün sistem hücrelerini aktifleştirebildiği *in vivo* olarak gösterilmiştir (Giri, Kruh, Dobos, & Schorey, 2010). Bakteriyel enfeksiyonlarda eksozomların etkisi ile ilgili bir diğer çalışmada ise hücre içi gram negatif bir bakteri türü olan *Salmonella typhimurium* ile enfekte olmuş insan makrofajlarından salınan eksozomlar, monositleri uyararak pro-enflamatuvar sitokin salınımını teşvik etmiştir (Bhatnagar, Shinagawa, Castellino, & Schorey, 2007). Bunun yanında, mikoplazma ile kontamine olmuş hücrelerden salınan eksozomların IL-10 üreten B10 hücrelerini aktive ettiği ve bunun da T hücre inhibisyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (Quah, & O'Neill, 2007). Diğer çalışmalarda ise *Chlamydia pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Franciscella tularensis* ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarında eksozomların konak yararına pro-enflamatuvar veya bakteri yararına anti-enflamatuvar etkileri endüklediği gösterilmiştir (Nandakumar, Windross, & Paludan, 2019; Russel ve ark., 2018).

Çalışmamızda brusellozun akut fazında granülosit-kökenli eksozomlar, izole ettiğimiz eksozomların %58'ini oluşturmuştur. Bu çalışmadaki, CD23 ekspresyonundaki bulgular dikkate alındığında, granülosit kökenli eksozomların büyük bir kısmının nötrofillerden salındığını düşündürmüştür. Nötrofiller ve doğal immün yanıtın diğer bileşenleri, herhangi bir bakteriyel enfeksiyonun elimine edilmesinde öncül olan, eksikliği ölümcül olabilen kuvvetlerdir. Nötrofiller, doğal immün yanıtın güçlü bir şekilde etkinliğini sağladıkları gibi edinsel immün yanıt için de zemin oluşturur. Birçok bakteriyel enfeksiyonun eliminasyonunda nötrofillerin eksikliği bakteri yararına katkılar sunar. Bakteriyel bir enfeksiyon sırasında nötrofiller IFN- γ gibi çeşitli sitokinlerin de etkisiyle ömürlerini uzatırlar, enfeksiyon temizlendikten sonra, konağa zarar vermemek amacıyla fosfatidilserin gibi molekülleri yüzeylerinde eksprese ederek apoptoz sinyalleri gönderirler. Fagositler tarafından anti enflamatuvar sitokinler salgılanarak, enfeksiyonun etkileri ortadan kaldırılır. Klasik nötrofil etkilerinin yanı sıra, bazı bakteri türleri nötrofil

fonksiyonunu etkileme stratejileri geliştirmiştir. *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella henselae* ve *Afipia felis*, *Shigella flexner* gibi bakteriler bu modülasyona örnek gösterilebilir. *Brucella* türlerine yakın akraba olan *Anaplasma phagocytophilum* bakterileri nötrofillerin veziküler biyogenezine müdahale ederek, membrana bağlı bir vezikül oluşturarak, lizozomal yıkıma uğramadan rahatlıkla replike olabilir (von Loewenich, Scorpio, Reisch, Dumler, & Bogdan, 2004). *Bartonella henselae* ve *Afipia felis* bakterileri de *Brucella* türlerine filogenetik açıdan yakın türlerdir. Bu bakteriler ise nötrofillerin oksidatif fonksiyonlarını bozarak hayatta kalırlar (Fumarola ve ark., 1994). *Shigella flexner* ise çeşitli proteinler salgılayarak nötrofilleri nekroza zorlarlar (François, Le Cabec, Dupont, Sansonetti, & Maridonneau-Parini, 2000). Bazı bakteri türlerinde nötrofil eksikliğinde, Th1 yanıtların endüklendiği gösterilmiştir. *Legionella pneumophila* enfeksiyonunun nötrofil eksikliğinde IFN- γ artışı ile birlikte Th1 polarizasyonunun endüklendiği gösterilmiştir (Shinozawa ve ark., 2002).

Brucella enfeksiyonu sonrası kompleman sistemi, immünoglobulinler ya da çeşitli reseptörlerle ile opsonize olan bakteriler hızlı bir şekilde nötrofiller tarafından fagositoza uğrar. Fagositoza uğrayan *Brucella* bakterilerinin nötrofiller içinde uzun süre hayatta kalabildiği ve bakterisidal etkilere dirençli olduğu bilinmektedir (Campbell, Adams, & Sowa, 1994; Huddleson, Johnson, & Hamann, 1933). Ancak nötrofillerin *Brucella* enfeksiyonlarında, rollerine dair sıra dışı çalışmalar mevcuttur. Fare bruselloz modelinde yapılan bir çalışmada, nötrofenik mutant farelerin bakterileri çok daha hızlı elimine ettiği gözlenmiştir. Bu farelerde, IFN- γ , IL-12 ve IL-6 sitokinlerinin ve aktifleşen makrofaj ve dendritik hücrelerinin artışı gözlenmiştir. Artan sitokinlerin etkisiyle Yardımcı T hücre 1 (Th1) yanıtları güçlenmiştir. Enfeksiyon hızlıca kontrol altına alındıktan sonra, pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar yanıtlar dengelenmiştir (Barquero-Calvo ve ark., 2013). Benzer bir çalışmada, normal bir fareye göre çok daha düşük miktarda antikör titresine sahip nötrofenili fareler, etkili bir edinsel immün yanıt geliştirmiştir (Fernandes, & Baldwin, 1995). *Brucella* enfeksiyonlarında nötrofillerin bu alışılmadık rolleri, nötrofillerden salınan eksozomların *Brucella* kökenli bazı ürünleri taşıyarak, enfeksiyonun yayılmasına destek olduğu düşünülebilir. Çalışmamızda granülosit kökenli eksozomlar incelendiğinde akut ve kronik bruselloz arasındaki anlamlı farklılığın yanı sıra, her iki hasta grubunda bu eksozom değerleri, sağlıklı kontrol grubuna göre

anlamli derecede yuksekti. Bu durum, enfeksiyonun akut fazinda notrofillerin bakteriyel yayilmaya destek olduğu ancak etkin bir immun cevap sonrası bu yayılmanın sekteye uğrayarak dormant bir evreye girdiğini gösterebilir. Tüm bu bilgiler ışığında, bruselloz enfeksiyonun kronikleşmesinde, bazı notrofiller içerisinde hayatta kalan *Brucella* bakterilerinin yayılma stratejilerini eksozomlar yoluyla sürdürebilmesinin rolü olabilir.

Nötrofil kökenli EV'ler üzerine yapılan bazı çalışmalar, bu veziküllerin değişken rollerine dikkat çekmiştir. Fizyolojik olarak benzer durumlarda, nötrofil kökenli eksozomlar, farklı hücreleri etkileyerek heterojen rolleri olduğu gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda, pro-enflamatuvar etkiler gösteren nötrofil kökenli-EV'ler bildirilmiştir. Bir çalışmada, nötrofil kökenli mikroveziküllerin insan endotelial hücrelere etki ederek, IL-6 salınımını artırmıştır (Mesri, & Altieri, 1998). Bir başka çalışmada ise, *M. tuberculosis* ile enfekte nötrofillerden salınan EV'lerin, makrofajların fagositer özelliklerini artırarak, bakteri eliminasyonuna katkı sunmuştur (Alvarez-Jiménez ve ark., 2018). Kistik fibroz hastalarıyla yapılan bir çalışmada, nötrofil kökenli EV'ler mukozal dokularda pro-enflamatuvar etkiler göstermiştir (Porro ve ark., 2013). Zıt şekilde, nötrofil kökenli EV'lerin anti-enflamatuvar etkiler gösterdiği birçok çalışma bulunmaktadır. Bir çalışmada apoptoz ile endüklenen nötrofillerden salınan mikroveziküllerin anti-enflamatuvar yanıtları tetiklediği gösterilmiştir. Bir çalışmada apoptotik nötrofillerden salınan EV'ler, dinlenme durumundaki Th hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederken IL-2/IL-2R ekspresyonunu engellemiştir (Shen ve ark., 2017). Bir diğer çalışmada ise, benzer fizyolojik koşullarda M1 makrofaj gelişimi engellenmiştir (Ren ve ark., 2008). Diğer çalışmalarda, bakteriyel yan ürünler kullanılarak endüklenen bazı nötrofillerinde anti-enflamatuvar etkileri sürdüreceği EV'ler salgıladığı gösterilmiştir. Bir çalışmada, bakteriyel yan ürün N-formilmetiyonil-lösil-fenilalanin (fMLP) ile endüklenen nötrofillerden kaynaklanan EV'ler, MeRTK-bağımlı olarak makrofajlarda anti-enflamatuvar etkileri tetiklemiştir (Eken, Martin, Sadallah, Treves, & Schifferli, 2010). Başka bir çalışmada ise, aynı etkenle uyarılan nötrofiller, NK hücrelerinin sitokin ekspresyonunu modüle ederek, IFN- γ ve TNF- α sitokinlerinin salınımını azaltırken, TGF- β salınımını artırmıştır (Pliyev, Kalintseva, Abdulaeva, Yarygin, & Savchenko, 2014). Bir diğer çalışmada ise, *M. tuberculosis* enfeksiyonuyla uyarılmış

nötrofillerden kökenlenen EV'ler de makrofaj aktivasyonunu engellemiştir (Duarte ve ark., 2012). Bu çalışmalarda gözlenebildiği gibi bazı fizyolojik durumlarda, nötrofillerden kökenlenen eksozomlar ve diğer ekstrasellüler veziküller, anti-enflamatuvar etkileri yönetebildiği düşünülebilir. Bunun yanında son yıllarda artan kanıtlar, bazı yazarların nötrofil kökenli eksozomlar için, *Brucella* enfeksiyonlarının "Truva atı" betimlemesi yapmalarına sebep olmuştur (Gutiérrez-Jiménez ve ark., 2019).

Kanser vakalarında miyeloid hücrelerin edinsel immün yanıt üzerindeki baskılayıcı etkileri yaklaşık 30 yıldır bilinmektedir. Sonrasında yapılan çalışmalar, bu hücrelerin yalnızca kanser olgularıyla sınırlı kalmadığını aynı zamanda bazı patolojik durumlarda da etkin rol oynadığını göstermiştir (Haile ve ark., 2008). MDSC'ler, olgunlaşmamış miyeloid hücrelerinin heterojen bir kısmını temsil eder. Genel olarak CD8⁺ T hücre yanıtını ve NK hücrelerini baskılayarak, düzenleyici hücreler olarak işlev görürler. Tümör immünitesindeki etkin rollerinin yanında, son yıllardaki çalışmalar bu hücrelerin bazı enflamatuvar moleküllerle endüklenebildiğini ve kronik enfeksiyon ve düzenleyici T hücre (Treg) gelişiminde rollerinin olabileceğini göstermiştir. Patojenle enfeksiyonun ardından, MDSC'lerin etkileri bir takım faktörlere bağlıdır. Hücre-hücre etkileşimlerinin yanı sıra bazı ekstrasellüler faktörlerin de bu aktivasyonu düzenlediği gösterilmiştir (Zhao, Wu, Shao, Shi, & Zhao, 2015). Genel olarak MDSC'ler iki alt grupta incelenirler; monositik kökenli MDSC'ler (M-MDSC) ve granülositik (nötrofilik) kökenli MDSC'ler (G-MDSC/ PMN-MDSC). Genel olarak, insanlarda MDSC'ler CD11b⁺ CD33⁺ HLA-DR^{low/neg} hücre fenotipini sergilerler. Bu MDSC'ler eğer CD14 sergilerse M-MDSC ve CD15 sergilerse G-MDSC olarak fenotipik açıdan ayrılırlar (Almand ve ark., 2001). MDSC'ler üzerine yapılan bazı çalışmalarla, bakteriyel enfeksiyonlarda bu hücrelerin rollerine dair bazı bulgular elde edilmiştir. *Staphylococcus aureus* enfeksiyonu ile ilgili yapılan birden fazla çalışmada, G-MDSC ve M-MDSC'lerin aktive olduğu ve bunun sonucunda edinsel immünitenin bazı mekanizmalarının baskılandığı gösterilmiştir (Skabytska ve ark., 2014; Thurlow ve ark., 2011). Benzer şekilde, *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonlarında MDSC'lerin baskılayıcı etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bunun yanında, MDSC'lerin anti-enflamatuvar etkilerinin yanı sıra *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsilla pneumoniae* enfeksiyonları

ve bazı sepsis durumlarında, konak yararına koruyucu etkiler bulundurduğu bazı çalışmalarla desteklenmiştir (Cai, Batra, Shen, Wakamatsu, & Jeyaseelan, 2009; Knaul ve ark., 2014; Rieber ve ark., 2013).

G-MDSC kökenli eksozomlar üzerine yapılmış bazı kanser çalışmalarında, immün yanıtın sınırlandırılmasında önemli rolleri bulunduğu gösterilmiştir. Kanser olgularından izole edilen G-MDSC kökenli eksozomların kargosunda hem anti-enflamatuvar hem de pro-enflamatuvar bazı moleküller izlenmiştir. Ayrıca bu eksozomların, köken aldığı MDSC'lerden içerik olarak farklılıklara sahip olabileceği gösterilmiştir (Fenselau, & Ostrand-Rosenberg, 2021) Bakteriyel enfeksiyonlarda G-MDSC kökenli eksozomlar ve ekstrasellüler veziküller ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamasına rağmen birçok kronik enfeksiyonda, bu eksozomların MDSC hücreleri arasındaki etkileşiminin önemi vurgulanmaktadır (Wang ve ark., 2016). Çalışmamızda, G-MDSC kökenli eksozomlarda, akut bruselloz ve kronik bruselloz arasındaki anlamlı fark gözlenmiştir. Akut brusellozda, G-MDSC kökenli eksozomların belirgin artışı, bu eksozomların hastalığın akut fazında immün sistemi düzenleyebilecek etkilere sahip olabileceğini gösterebilir. Aynı zamanda her iki hastalık grubunda, sağlıklı kontrole göre anlamlı artışlar gözlenmiştir. Nötrofil kökenli eksozomlar *Brucella* bakterilerinin yayılımına destek sağlarken, G-MDSC-kökenli eksozomlar ise bu yayılmayı kolaylaştırmak için pro-enflamatuvar yanıtları baskılayabilir.

Akut brusellozun, enfekte kolit hastalığında önemli bir etken olduğuna dair bazı çalışmalar mevcuttur. Bu hipoteze göre bazı ülseratif ve enfeksiyonel kolit modelleri, *Brucella* enfeksiyonlarıyla ilişkili olarak gelişmektedir. G-MDSC kökenli eksozomların, kolit hastalığındaki etkilerine dair birkaç çalışma mevcuttur. Bir çalışmada, kolit fare modelinde G-MDSC kökenli eksozomların arjinaz-I (Arg-I) aktivitesini bozarak, Treg aktivasyonunu teşvik ettiği, T hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve tetiklenen gecikmiş tipte aşırı enflamasyon reaksiyonlarını da elimine ettiği gösterildi. Ayrıca, farelerin serumlarında, IFN- γ ve TNF- α gibi sitokinlerin azaldığı gözlenmiştir (Wang ve ark., 2016). Bazı çalışmalara göre sıklıkla *Brucella* enfeksiyonları ile ilişkilendirilen bu hastalıktaki G-MDSC eksozom profili güçlü bir immün baskılama etkisini ortaya koymuştur (Zhu ve ark., 2019).

Brucella, enfeksiyonun ilk aşamalarında ASH'ler tarafından fagositoza uğrar ve bunun sonucunda IL-2 ve IL-12 gibi sitokinler üretilir. IL-12 ile aktive olan NK hücreleri enfekte hücreleri elimine etmeye başlar. Bunun yanında, IFN- γ gibi bazı sitokinleri de üreterek makrofajların uyarılmasına destek olur (Roitt, Brostoff, & Male, 2001). NK hücrelerinin brusellozdaki etkinliğine dair yapılan bazı fare çalışmalarında, NK hücrelerinin eksikliğinin enfeksiyonun başlangıç aşamasında, immün yanıtı değiştirmedeği ortaya konmuştur (Fernandes, Benson, & Baldwin, 1995). Ancak bu bulgu, bruselloz enfeksiyonlarında NK hücrelerinin etkisiz eleman olmasından çok, farelerin *Brucella*'ya karşı oluşturduğu immün yanıtların, NK-bağımsız halde bile oldukça yeterli olmasından kaynaklanıyor olabilir. *Brucella* enfeksiyonlarında anahtar sitokinlerden biri olan IFN- γ 'nın en önemli kaynaklarından biri NK hücreleridir. NK hücrelerinin etkinliğine dair yapılan bir çalışmada, hastalığın akut fazında, NK hücrelerinin aktivitesinde bazı bozulmalar gözlenmiştir (Dornand ve ark., 2004). NK hücrelerinin daha önce *M. tuberculosis* çalışmalarında gösterildiği gibi hücre-içi yerleşimli bakterilere karşı öldürme yetenekleri oldukça gelişmiştir. Bir çalışmada, *B. suis* ile enfekte makrofajlar tarafından endüklenen NK hücreleri, enfekte hücreleri elimine etmiş ve hücre içi replikasyonu engellemiştir (Brill ve ark., 2001). Isıyla öldürülmüş *B. abortus* (heat-killed *Brucella abortus*; HKBA), birçok deneysel fare çalışmalarında *Brucella* enfeksiyonlarının benzer etkilerini *in vitro* oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır. Bir fare çalışmasında HKBA kullanılarak, immün yanıtlar tetiklenmiş ve NK hücrelerinin B hücrelerinin poliklonal antikor üretiminde rolleri olabileceği gösterilmiştir (Gao, Jennings, Guo, & Yuan, 2011). Daha önce yapılan bir başka çalışmada ise NK hücrelerinin IFN- γ ekspresyon profili ve *Brucella*-spesifik IgG2a antikorlarının üretimi arasında bir ilişki ortaya konmuştur (Satoskar ve ark., 1999). NK hücrelerinin brusellozun erken aşamalarındaki rolleri henüz belirsizliğini korusa da hastalığın ileri safhalarında etkili rolleri söz konusu olabilir. Ancak, bazı yazarların daha önce rapor ettiği gibi, özellikle hastalığın akut fazında, NK hücrelerinin sitokin salınımı ve sitotoksik etkilerinde gözlenen bazı düzensizlikler, NK hücrelerinin *Brucella* bakterilerine karşı verdiği yanıtların sınırlandığını düşündürülebilir. NK hücrelerinin bu sınırlı aktivasyonlarındaki olumsuz etkileri IL-2 sitokini ile eski haline getirebileceğine dair bazı yazarların görüşleri bulunmaktadır (Salmeron ve ark., 1992). Çalışmamızda kronik brusellozda, NK hücre kökenli

eksozomlar, sağlıklı kontrole göre anlamlı derecede düşük bulunmakla birlikte akut bruselloz ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. Bu durum NK hücrelerinin kronik brusellozda baskılandığını düşündürebilir ancak bu hücrelerin litik aktivitesi hakkında herhangi bir bulgu bulunmamaktadır.

Bruselloz da bazı vakalarda, hemolitik anemi ve trombositopeni gibi immün reaksiyonlar bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda, özellikle hastalığın kronik fazında *Brucella* kaynaklı trombositopeninin, kemik iliğinde granülatöz oluşumuna destek olabileceği bulgusuna ulaşılmıştır. Trombosit kökenli EV'ler (P-EV'ler) ile yapılan çalışmalarda, hücre içi iletişim, pıhtı oluşumu, hücreler arası transfer ve enflamasyonda rolleri olabileceği vurgulanmıştır (Boilard ve ark., 2010; Risitano, Beaulieu, Vitseva, & Feedman, 2012 ; Tafelmeier ve ark., 2017). Trombosit kökenli eksozomların ise, trombosit fonksiyonlarını artırıcı etkiler ve pro-enflamatuvar monosit aktivasyonu gibi bazı fonksiyonları bildirilmiştir (Mause, von Hundelshause, Zerneck, Koenen, & Weber, 2005; Rautou ve ark., 2011;). Sepsiste trombosit-kökenli eksozomlara dair bir çalışmada, bu eksozomların nötrofil ekstrasellüler tuzak (NET) oluşumunu endüklediği gösterilmiştir (Jiao ve ark., 2020). Septik şok üzerine yapılan bir başka çalışmada ise, trombosit kökenli eksozomların peroksinitrit yoluyla endotel hücrelerde apoptozu tetiklediğini göstermiştir (Gambim ve ark., 2007). Trombosit kökenli eksozomlar, diğer P-EV'lerden içerik olarak farklılık gösterebilir. P-EV'lerde olan protrombin ve Factor X gibi moleküllerden eksozomlar mahrumdur. Bunun yanında trombosit-kökenli eksozomlarda ise, P-selektin, PF4 ve GPIIb/IIIa gibi trombosit ile ilişki proteinler bulunmaktadır (Heijnen, Schiel, Fijnheer, Geuze & Sixma, 1999). Çalışmamızda kronik brusellozda, trombosit kökenli eksozomlar, sağlıklı kontrole göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Akut bruselloz ve sağlıklı kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Trombosit kökenli eksozomların hastalığın kronik evresinde anlamlı derecede azalması, hastalığın kronikleşmesinde önemli etken olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, eksozomların brusellozda önemli etkileri olabileceğini düşündürmüştür. İlk keşfinden itibaren uzun yıllar geçmesine rağmen eksozomlar hala büyük potansiyel vadetmektedir. Her üç araştırma grubu arasında, granülosit kökenli eksozomlardaki anlamlı farklar, nötrofillerin bu hastalığın

kronikleşmesi ve enfeksiyonun yayılımında bazı kilit rollere sahip olabileceğini göstermektedir. Bunun yanında G-MDSC kökenli eksozomların da, benzer bir profil sergilemesi, hem nötrofil hem de G-MDSC kökenli eksozomların iş birliği içerisinde bakteri yararına fonksiyon gösterdiğini ortaya koyabilir. Aynı zamanda, kronik brusellozda trombosit ve NK kökenli eksozomlardaki anlamlı azalmalar, hastalığın bu fazında, konak immün yanıtın, *Brucella* bakterileri tarafından modüle edildiğini gösterebilir. *Brucella* bakterilerinin, klasik bakteriyel bazı özelliklerden yoksun olması ve bazı sıra dışı özelliklerinin bulunması, immün sistemin bilinmeyen birçok özelliğini açığa çıkarabilir. Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular bruselloz literatürüne önemli katkılar sağlayabilir ancak brusellozda eksozomların rolünün tam olarak anlaşılabilmesi için ek çalışmalar gerektiği açıktır. Analiz edilen vaka sayılarının artırılması, doğru bir immünofenotiplendirme için oldukça önemlidir. Anabilim dalımızda daha önce yapılan birden fazla çalışmada, akut ve kronik brusellozda T hücre miRNA profili ortaya konmuştur. Bu çalışmaya göre hastalığın akut ve kronik fazlarında farklı miRNA'lar işlev görebilmektedir. Bunun yanında, bruselloz vakalarındaki mRNA profiline dair bir başka çalışmamız yazım aşamasındadır. Eksozomların kargo içeriklerinde sıklıkla bulunan miRNA, mRNA ve diğer genetik materyallerin hastalığın kronikleşmesinde etkileri söz konusu olabilir. Nötrofil kökenli eksozomlar için bazı yayınlarda belirtildiği gibi "Truva atı" fenomeninin açıklığa kavuşturulması için eksozomal kargo içeriğinin ortaya çıkarılması gerekmektedir. Bunun yanında, G-MDSC ve nötrofil kökenli eksozomların etkilerinin doğru şekilde ortaya konması için fonksiyonel hücre kültürü deneylerinin yapılmasına ihtiyaç vardır. Bazı yayınlarda *Brucella* bakterileri ile ilişkilendirilen kolit hastalığı ve brusellozun karşılaştırmalı çalışmaları, her iki hastalığın immünojenliğine katkılar sağlayacaktır.

6- KAYNAKLAR

- Adams, L. G. (1998, February). Animal health issues in South Texas cattle. In *Workshop on beef cattle production systems and natural resources conservation in semi-arid lands of South Texas and Northern Mexico held at Universidad Auto'noma dr Tamaulipas, Cd. Victoria, Tamaulipas, Mexico* (pp. 26-27).
- Alavi, S. M., & Alavi, L. (2013). Treatment of brucellosis: a systematic review of studies in recent twenty years. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 4(2), 636–641.
- Almand, B., Clark, J. I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N. R., Knight, S. C., ... & Gabilovich, D. I. (2001). Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *The Journal of Immunology*, 166(1), 678-689.
- Alton, G. G., Corner, L. A., & Plackett, P. (1983). The role of the differential complement fixation test, using rough and smooth Brucella antigens, in the anamnestic test. *Australian Veterinary Journal*, 60(1), 4-6.
- Alvarez-Jiménez, V. D., Leyva-Paredes, K., García-Martínez, M., Vázquez-Flores, L., García-Paredes, V. G., Campillo-Navarro, M., ... & Estrada-García, I. (2018). Extracellular vesicles released from Mycobacterium tuberculosis-infected neutrophils promote macrophage autophagy and decrease intracellular mycobacterial survival. *Frontiers in immunology*, 9, 272.
- André, F., Chaput, N., Schartz, N. E., Flament, C., Aubert, N., Bernard, J., ... Zitvogel, L. (2004). Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(4), 2126–2136. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2126>
- Angélique Bobrie, Marina Colombo, Sophie Krumeich, Graça Raposo & Clotilde Théry (2012) Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation, *Journal of Extracellular Vesicles*, 1:1, DOI: [10.3402/jev.v1i0.18397](https://doi.org/10.3402/jev.v1i0.18397)
- Araj, G. F. (2010). Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, S12-S17.
- Ariza, J., Pellicer, T., Pallares, A., Foz, A., Gudiol, F. (1992). Specific antibody profile in human brucellosis. *Clinical and Infectious Diseases* 14,131-140.
- Atik, A., Stewart, T., & Zhang, J. (2016). Alpha-Synuclein as a Biomarker for Parkinson's Disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 26(3), 410–418. <https://doi.org/10.1111/bpa.12370>

- Azevedo, L. C., Janiszewski, M., Pontieri, V., Pedro, M., Bassi, E., ...Laurindo, F. R. (2007). Platelet-derived exosomes from septic shock patients induce myocardial dysfunction. *Critical Care (London, England)*, 11(6), R120. <https://doi.org/10.1186/cc6176>
- Baily, G. G., Krahn, J. B., Drasar, B. S., & Stoker, N. G. (1992). Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(4), 271–275.
- Baldwin, C.L., Jiang, X. and Fernandes, D.M. Macrophage control of *Brucella abortus*: influence of cytokines and iron. *Trends Microbiol.* 1993; 1: 99 – 104.
- Barquero-Calvo, E., Martirosyan, A., Ordoñez-Rueda, D., Arce-Gorvel, V., Alfaro-Alarcón, A., Lepidi, H., ... Moreno, E. (2013). Neutrophils exert a suppressive effect on Th1 responses to intracellular pathogen *Brucella abortus*. *PLoS Pathog*, 9(2), e1003167.
- Baysal B. *Brucella*. In: Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö, Eds.(1999). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi,571-577.
- Beatty, W.L., Rhoades, E.R., Ullrich, H.-J., Chatterjee, D., Heuser, J.E. and Russell, D.G. (2000), Trafficking and Release of Mycobacterial Lipids from Infected Macrophages. *Traffic*, 1: 235-247. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010306.x>
- Benjamin, B, Annobil, S.H (1992). Childhood brucellosis in southwestern Saudi Arabia: A 5-year experience. *Journal of Tropical Pediatrics* 38, 167-172.
- Bessoles, S., Dudal, S., Besra, G. S., Sanchez, F., & Lafont, V. (2009). Human CD4+ invariant NKT cells are involved in antibacterial immunity against *Brucella suis* through CD1d-dependent but CD4-independent mechanisms. *European Journal of Immunology*, 39(4), 1025–1035. <https://doi.org/10.1002/eji.200838929>.
- Bhatnagar, S., & Schorey, J. S. (2007). Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory. *J Biol Chem*, 282(35), 25779-25789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702277200>
- Billard, E., Cazeville, C., Dornand, J., & Gross, A. (2005). High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Infection and Immunity*, 73(12), 8418.
- Bishop, G. C., Bosman, P. P., & Herr, S. (1994). Bovine brucellosis. Infectious diseases of livestock with Special Reference to Southern Africa. *Cape Town: Oxford University Press Southern Africa*.
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., & Thery, C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, 12(12), 1659-1668. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x>

Boilard, E., Nigrovic, P. A., Larabee, K., Watts, G. F., Coblyn, J. S., Weinblatt, M. E., Massarotti, E. M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R. W., Ware, J., & Lee, D. M. (2010). Trombosits amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5965), 580–583. <https://doi.org/10.1126/science.1181928>

Bricker, B. J. (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 435-446.

Brill, K. J., Li, Q., Larkin, R., Canaday, D. H., Kaplan, D. R., ... & Silver, R. F. (2001). Human natural killer cells mediate killing of intracellular Mycobacterium tuberculosis H37Rv via granule-independent mechanisms. *Infection and immunity*, 69(3), 1755-1765.

Bruselloz İstatistik verileri [Internet]. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı (2017), Erişim adresi : <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoonotikvektorel-bruselloz/istatistik>

Buzgan, T., Karahocagil, M. K., Irmak, H., Baran, A. I., Karsen, H.,...,Akdeniz, H. (2010). Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(6), e469-e478.

Cai, S., Batra, S., Shen, L., Wakamatsu, N., and Jeyaseelan, S. (2009). Both TRIF- and MyD88-dependent signaling contribute to host defense against pulmonary Klebsiella infection. *J. Immunol.* 183, 6629–6638. doi: 10.4049/jimmunol.0901033

Campbell GA, Adams LG, Sowa BA. 1994. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol* 41: 295–306. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)90103-1](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)90103-1).

Capasso, L., (2002). Bacteria in two-millenia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *J. Infect.* 45, 122–127. <https://doi.org/10.1053/jinf.2002.0996>

Cardoso, P.G., Macedo, G.C., Azevedo, V., & Oliveira, S. (2006). *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*, 5, 13 - 13.

Casabuono, A. C., Czibener, C., Del Giudice, M. G., Valguarnera, E., Ugalde, J. E., & Couto, A. S. (2017). New Features in the Lipid A Structure of *Brucella suis* and *Brucella abortus* Lipopolysaccharide. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(12), 2716–2723. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1805-x>

Celli, J., and Tsolis, R. M. (2015). Bacteria, the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: friends or foes? *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 71–82. doi: 10.1038/nrmicro3393

Clayton, A., Court, J., Navabi, H., Adams, M., Mason, M. D., Hobot, J. A., ... Jasani, B. (2001). Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-

magnetic isolation and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 247(1-2), 163–174. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(00\)00321-5](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(00)00321-5)

Clayton, A., Turkes, A., Navabi, H., Mason, M. D., & Tabi, Z. (2005). Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 16), 3631–3638. <https://doi.org/10.1242/jcs.02494>

Cocucci, E., G. Racchetti, and J. Meldolesi. (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 19(2). 43-51

Coelho, A. C., Díez, J. G., & Coelho, A. M. (2015). Risk Factors for *Brucella* spp. in Domestic and Wild Animals. In *Updates on Brucellosis*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61325>

Cohen J, Powderly WG, Eds. (2004). *Infectious Diseases*. 2nd Ed. St. Louis: Mosby Company. 1665-1667.

Colmenero, J D., Reguera, J M., Cabrera, F P., Hernandez, S., Porrás, J., ...Miranda, M T. (1989). [Combined use of Rose Bengal and indirect immunofluorescence in the diagnosis of brucellosis]. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 6.(7).316-320.

Colmenero, J. D., Reguera, J. M., Martos, F., Sánchez-De-Mora, D., Delgado, M., Causse, ...Juárez, C. (1996). Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. *Medicine*, 75(4), 195–211. <https://doi.org/10.1097/00005792-199607000-00003>

Corbel M. J. (1997). Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases*, 3(2), 213–221. <https://doi.org/10.3201/eid0302.970219>

Corbel, M J and Brinley-Morgan, W J. (1984). Genus *Brucella* in: Krieg N.R., Holt J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore. (1).377-388.

Corbel, M. J, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization & World Organisation for Animal Health. (2006). Brucellosis in humans and animals. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43597>

Corbel, M.J (1988). *Brucellosis in fertility and infertility in veterinary practice* edited by: Laing, J.A, Brinley Morgan, W.J and Wagner W.C. Bailliere Tindall. London. pp 280.

Corbel, MJ (1999) Brucellosis an overview. <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/brucella/corbel.htm>

Crenshaw, B. J., Sims, B., & Matthews, Q. L. (2018). Biological function of exosomes as diagnostic markers and therapeutic delivery vehicles in carcinogenesis and infectious diseases. In *Nanomedicines*. IntechOpen.

- D'Anastasio, R., Zipfel, B., Moggi-Cecchi, J., Stanyon, R., Capasso, L., (2009). Possible brucellosis in an early hominin skeleton from sterkfontein, South Africa. *PLoS One* 4, e6439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006439>
- de Figueiredo, P., Ficht, T. A., Rice-Ficht, A., Rossetti, C. A., & Adams, L. G. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions. *The American Journal of Pathology*, 185(6), 1505–1517. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.003>
- de Jong, M. F., Sun, Y. H., den Hartigh, A. B., van Dijl, J. M., & Tsolis, R. M. (2008). Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Molecular Microbiology*, 70(6), 1378–1396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06487.x>
- Dean, A. S., Crump, L., Greter, H., Schelling, E., & Zinsstag, J. (2012). Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10), e1865. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001865>
- Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, ... Letesson, J. J. (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cellular Microbiology*, 3(7), 487–497. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00131.x>
- DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Redkar, R. J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., ... & Overbeek, R. (2002). The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1), 443-448.
- Doganay, M., & Mese Alp, E. (2008). Infeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. *Nobel Tıp Kitabevleri*, 3, 897-909.
- Dornand, J., Gross, A., Lafont, V., Liautard, J., Oliaro, J., & Liautard, J. P. (2002). The innate immune response against *Brucella* in humans. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 383-394.
- Dornand, J., Lafont, V., Oliaro, J., Terraza, A., Castaneda-Roldan, E., & Liautard, J. P. (2004). Impairment of intramacrophagic *Brucella suis* multiplication by human natural killer cells through a contact-dependent mechanism. *Infection and Immunity*, 72(4), 2303.
- Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7), 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Duarte, T. A., Noronha-Dutra, A. A., Nery, J. S., Ribeiro, S. B., Pitanga, T. N., Lapa e Silva, J. R., Arruda, S., & Boéchat, N. (2012). Mycobacterium tuberculosis-induced neutrophil ectosomes decrease macrophage activation. *Tuberculosis*, 92(3), 218-225. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2012.02.007>

- Eberl G, Brawand P, MacDonald HR (2000) Selective bystander proliferation of memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells upon NK-T or T cell activation. *J Immunol* 165: 4305.
- Eken, C., Martin, P. J., Sadallah, S., Treves, S., Schaller, M., & Schifferli, J. A. (2010). Ectosomes released by polymorphonuclear neutrophils induce a MerTK-dependent anti-inflammatory pathway in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 39914–39921. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.126748>
- Ertek M. (2003). Bruselloz: Klinik formları ve özellikleri. *Ankem Dergisi*.17: 333-5.
- Evans, A., (1918). Further Studies on Bacterium Abortus and Related Bacteria : II . A Comparison of Bacterium Abortus with Bacterium Bronchisepticus and with the Organism Which Causes Malta Fever. *J. Infect. Dis.* 22, 580–593
- Fernandes DM, Baldwin CL. 1995. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infect Immun* 63:1130 –1133. <https://doi.org/10.1128/IAI.63.3.1130-1133.1995>
- Fernandes, D. M., Benson, R., & Baldwin, C. L. (1995). Lack of a role for natural killer cells in early control of *Brucella abortus* 2308 infections in mice. *Infection and Immunity*, 63(10), 4029.
- Ficht T. A. (2003). Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Veterinary Microbiology*, 92(3), 213–223. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00367-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00367-x)
- Forestier, C., Moreno, E., Pizarro-Cerda, J., and Gorvel, J. P., 1999, Lysosomal accumulation and recycling of lipopolysaccharide to the cell surface of murine macrophages, an in vitro and in vivo study, *The Journal of Immunology*, 162, 6784-6791.
- François M, Le Cabec V, Dupont MA, Sansonetti PJ, Maridonneau-Parini I. (2000). Induction of necrosis in human neutrophils by *Shigella flexneri* requires type III secretion, IpaB and IpaC invasins, and actin polymerization. *Infect Immun* 68:1289 – 1296. <https://doi.org/10.1128/iai.68.3.1289-1296.2000>.
- Fumarola, D., Pece, S., Fumarulo, R., Petruzzelli, R., Greco, B., Giuliani, G., ... & Jirillo, E. (1994). Downregulation of Human Polymorphonuclear Cell Activities Exerted by Microorganisms Belonging to the α -2 Subgroup of Proteobacteria (*Afipia* Fs and *Rochallmaea Henselae*). *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 16(3), 449-461.
- Galińska, E. M., Zagórski, J. (2013). Brucellosis in humans – etiology, diagnostics, clinical forms. *Ann Agric Environ Med.*, 20(2), 233-238.
- Gambim, M. H., do Carmo, A., Marti, L., Veríssimo-Filho, S., Lopes, L. R., & Janiszewski, M. (2007). Trombosit-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel

mechanism of septic vascular dysfunction. *Critical care (London, England)*, 11(5), R107. <https://doi.org/10.1186/cc6133>

Gao, N., Jennings, P., Guo, Y., & Yuan, D. (2011). Regulatory role of natural killer (NK) cells on antibody responses to *Brucella abortus*. *Innate immunity*, 17(2), 152-163.

Garin-Bastuji, B., Blasco, J. M., Marin, C., & Albert, D. (2006). The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. *Small Ruminant Research*, 62(1-2), 63-70.

Ghassan, M, Issam, A.K, Alex, M.A.(1996). Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 477-478.

Giri, P. K., & Schorey, J. S. (2008). Exosomes derived from *M. Bovis* BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells in vitro and in vivo. *PLoS one*, 3(6), e2461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002461>

Glowacka, P., Zakowska, D., Naylor, K., Niemcewicz, M., & Bielawska-Drozd, A. (2018). *Brucella*-Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. *Polish Journal of Microbiology*, 67(2), 151.

Golding, B., Scott, D. E., Scharf, O., Huang, L. Y., Zaitseva, M., Lapham, C., ... & Golding, H. (2001). Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and Infection*, 3(1), 43-48.

Goldstein, J., Hoffman, T., Frasnich, C., Lizzio, E. F., Beining, P. R., Hochstein, D., ... & Golding, B. (1992). Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines. *Infection and Immunity*, 60(4), 1385.

Gorvel J. P. (2014). "If you bring an alarm, we will destroy it," said *Brucella* to the host cell. *Virulence*, 5(4), 460–462. <https://doi.org/10.4161/viru.29092>

Greening, D. W., Gopal, S. K., Xu, R., Simpson, R. J., & Chen, W. (2015). Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 40, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.02.009>

Grunow, R., Jacob, D., Klee, S., Schlembach, D., Jackowski-Dohrmann, S., Loening-Baucke, V., Eberspächer, B., & Swidsinski, S. (2016). Brucellosis in a refugee who migrated from Syria to Germany and lessons learnt, 2016. *Euro surveillance : Bulletin Europeen sur les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 21(31), 30311. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.31.30311>

Gul, S., & Khan, A., (2007). Epidemiology and epizootology of brucellosis: A review. *Pakistan Veterinary Journal*. 27. 145-151.

Gutiérrez-Jiménez, C., Mora-Cartín, R., Altamirano-Silva, P., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., Moreno, E., & Barquero-Calvo, E. (2019). Neutrophils as Trojan

Horse Vehicles for *Brucella abortus* Macrophage Infection. *Frontiers in immunology*, 10, 1012. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01012>

Haile, L. A., von Wasielewski, R., Gamrekashvili, J., Krüger, C., Bachmann, O., Westendorf, A. M., Buer, J., Liblau, R., Manns, M. P., Korangy, F., & Greten, T. F. (2008). Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology*, 135(3), 871–881. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.06.032>

Halling, S. M. and S. M. Boyle, (2002). Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet. Microbiol.*90: 81-110.

Halling, S. M., Peterson-Burch, B. D., Bricker, B. J., Zuerner, R. L., Qing, Z., Li, L. L., ... & Olsen, S. C. (2005). Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Journal of Bacteriology*, 187(8), 2715.

Heijnen, H. F. G., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J., & Sixma, J. J. (1999). Activated Trombosit Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and -Granules. *Blood*, 94(11), 3791-3799. <https://doi.org/10.1182/blood.V94.11.3791>

Hippocrates, 400BC. Aphorisms. The Internet Classics Archive, (1994-2009), Web Atomic. Erişim adresi: <http://classics.mit.edu/Hippocrates/aphorisms.html>

Huddleson IF, Johnson HW, Hamann EE. 1933. A study of the opsonocytaphagic power of the blood and allergic skin reaction in *Brucella* infection and immunity in man. *Am J Public Health Nations Health* 23:917–929. <https://doi.org/10.2105/ajph.23.9.917>.

Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO journal*, 30(17), 3481-3500.

Jaber, L., Dahan, S., Harari, I. (1999). Control of brucellosis in Taibe. *Herefuah*. 137,454-456.

Jiang, Y., Qian, J., Yang, J., Yan, X., Xue, X., & Chang, Q. (2018). Advances in exosome-related biomarkers for glioblastoma: Basic research and clinical application. *Glioma*, 1, 159 - 167.

Jiao, Y., Li, W., Wang, W., Tong, X., Xia, R., Fan, J., Du, J., Zhang, C., & Shi, X. (2020). Trombosit-derived exosomes promote neutrophil extracellular trap formation during septic shock. *Critical Care*, 24.

Jones, L. B., Bell, C. R., Bibb, K. E., Gu, L., Coats, M. T., & Matthews, Q. L. (2018). Pathogens and Their Effect on Exosome Biogenesis and Composition. *Biomedicines*, 6(3), 79. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6030079>

Jubier-Maurin, V., Boigegrain, R. A., Cloeckert, A., Gross, A., Alvarez-Martinez, M. T., Terraza, A., ... & Liautard, J. P. (2001). Major outer membrane protein *Omp25* of

Brucella suis is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. *Infection and Immunity*, 69(8), 4823.

Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M., & Tanabe, M. (2021). KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D545–D551. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa970>

Kang J. S. (2020). The potential of exosomes as theragnostics in various clinical situations. *Exosomes*, 467–486. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816053-4.00020-1>

Keller, S., Rupp, C., Stoeck, A., Runz, S., Fogel, M., Lugert, S., ... & Altevogt, P. (2007). CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney International*, 72(9), 1095-1102.

Knaul, J. K., Jorg, S., Oberbeck-Mueller, D., Heinemann, E., Scheuermann, L., Brinkmann, V., et al. (2014). Lung-residing myeloid-derived suppressors display dual functionality in murine pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190, 1053–1066. doi: 10.1164/rccm.201405-0828OC

Ko, J., & Splitter, G. A. (2003). Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 65.

Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., & Liautard, J. P. (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15711–15716. <https://doi.org/10.1073/pnas.232454299>

Kowal, J., Tkach, M., & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>

Kramer, B., Pelchen-Matthews, A., Deneka, M., Garcia, E., Piguet, V., & Marsh, M. (2005). HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood cells, molecules & diseases*, 35(2), 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.06.006>

Kreutzer, D. L., Dreyfus, L. A. and Robertson, D. C. (1979) Interactions of polymorphonuclear leukocytes with smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, 23, 737-742

Królak, M., & Błaszczuk, B. (1986). Standaryzacja odczynu wiązania dopełniacza (OWD) przy brucelozie. II. Antygen [Standardization of the complement fixation test (CFT) in brucellosis. II. The antigen]. *Polskie archiwum weterynaryjne*, 25(1), 17–31.

Kruh-Garcia, N. A., Wolfe, L. M., & Dobos, K. M. (2015). Deciphering the role of exosomes in tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 95(1), 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.10.010>

- Lamparski, H. G., Metha-Damani, A., Yao, J. Y., Patel, S., Hsu, D. H., Ruegg, C., & Le Pecq, J. B. (2002). Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *Journal of Immunological Methods*, 270(2), 211–226. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(02\)00330-7](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(02)00330-7)
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2005). Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current opinion in microbiology*, 8(1), 60-66.
- Lavigne, J. P., Patey, G., Sangari, F. J., Bourg, G., Ramuz, M., O'Callaghan, D., & Michaux-Charachon, S. (2005). Identification of a new virulence factor, BvfA, in *Brucella suis*. *Infection and immunity*, 73(9), 5524–5529. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5524-5529.2005>
- Ledwaba, M. B., Ndumnego, O. C., Matle, I., Gelaw, A. K., & Van Heerden, H. (2020). Investigating selective media for optimal isolation of *Brucella* spp. in South Africa. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 87(1), e1–e9. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v87i1.1792>
- Lim, Matthew L, Rickman, Leland S.(2004) Brucellosis, *Infectious Diseases in Clinical Practice*, Volume 12 - Issue1 - p 7-14 doi: 10.1097/01.idc.0000104894.16995.c4
- Liu, W., Bai, X., Zhang, A., Huang, J., Xu, S., & Zhang, J. (2019). Role of Exosomes in Central Nervous System Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 240. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00240>
- Liu, Z., Wei, D., Li, Y., Zhou, H., Huang, D., & Guan, P. (2020). Different Clinical Manifestations of Human Brucellosis in Pregnant Women: A Systematic Scoping Review of 521 Cases from 10 Countries. *Infection and Drug Resistance*, 13, 1067–1079. <https://doi.org/10.2147/IDR.S248779>
- Lucero, N E., Foglia, L., Ayala, S M., Gall, D and Nielsen, K. (1999). Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 10.(37).3245-3248.
- Lulu, A. R., Araj, G. F., Khateeb, M. I., Mustafa, M. Y., Yusuf, A. R., & Fenech, F. F. (1988). Human brucellosis in Kuwait: a prospective study of 400 cases. *QJM: An International Journal of Medicine*, 66(1), 39-54.
- Machida, T., Tomofuji, T., Ekuni, D., Maruyama, T., Yoneda, T., Kawabata, Y., ... & Morita, M. (2015). MicroRNAs in salivary exosome as potential biomarkers of aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 21294-21309.
- Madkour, M. M. (2012). *Madkour's Brucellosis*. Springer Science & Business Media.
- Mancilla M. (2016). Smooth to Rough Dissociation in *Brucella*: The Missing Link to Virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 98. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00098>

- Mause, S. F., von Hundelshausen, P., Zerneck, A., Koenen, R. R., and Weber, C. (2005) Trombosit microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1512–1518
- Mesri, M., & Altieri, D. C. (1998). Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *The Journal of Immunology*, 161(8), 4382-4387.
- Meyer M.E. (1981). The Genus *Brucella*. In: Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_84
- Miao, C., Wang, X., Zhou, W., & Huang, J. (2021). The emerging roles of exosomes in autoimmune diseases, with special emphasis on microRNAs in exosomes. *Pharmacol Res*, 169, 105680. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105680>
- Michaux, S., Paillisson, J., Carles-Nurit, M. J., Bourg, G., Allardet-Servent, A., & Ramuz, M. (1993). Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *Journal of bacteriology*, 175(3), 701–705. <https://doi.org/10.1128/jb.175.3.701-705.1993>
- Miendje Deyi, V. Y., Mori, M., Dauby, N., Clevenbergh, P., Mahadeb, B., Loizidou, A., Maillart, E., Martiny, D., Debytere, A. L., Gerard, M., & Hallin, M. (2021). Staggered enforcement of infection control and prevention measures following four consecutive potential laboratory exposures to imported *Brucella melitensis*. *Infection Prevention in Practice*, 3(2), 100128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.infpip.2021.100128>
- Mili, N., Auckenthaler, R., & Nicod, L. P. (1993). Chronic brucella empyema. *Chest*, 103(2), 620–621. <https://doi.org/10.1378/chest.103.2.620>
- Mongiú-Tortajada, M., Lauzurica-Valdemoros, R., & Borràs, F. E. (2014). Tolerance in organ transplantation: from conventional immunosuppression to extracellular vesicles. *Frontiers in Immunology*, 5, 416. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00416>
- Moreno, Edgardo & Gorvel, Jean. (2004). Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and non-professional phagocytes. *Brucella: Molecular and Cellular Biology*. 287-312.
- Murphy, E. A., Sathiyaseelan, J., Parent, M. A., Zou, B., & Baldwin, C. L. (2001). Interferon- γ is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunology*, 103(4), 511-518.
- Nazimek, K., Bryniarski, K., & Askenase, P. W. (2016). Functions of Exosomes and Microbial Extracellular Vesicles in Allergy and Contact and Delayed-Type Hypersensitivity. *International Archives of Allergy and Immunology*, 171(1), 1–26. <https://doi.org/10.1159/000449249>
- Nguyen, D. G., Booth, A., Gould, S. J., & Hildreth, J. E. (2003). Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *The*

Journal of Biological Chemistry, 278(52), 52347–52354.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M309009200>

Nielsen, K. R., Kelly, L., Gall, D., Nicolette, P., Kelly, W. (1995). Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 46,285-291.

Nielsen, K., Lin, M., Gall, D and Jolley, M. (2000). Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*. *Methods*. 1.(22).71- 76.

Oliaro, J., Dudal, S., Liautard, J., Andrault, J. B., Liautard, J. P., & Lafont, V. (2005). V γ 9V δ 2 T cells use a combination of mechanisms to limit the spread of the pathogenic bacteria *Brucella*. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(5), 652-660.

Oliveira, S. C., & Splitter, G. A. (1995). CD8⁺ type 1 CD44^{hi} CD45^{RBlo} T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I-and class II-deficient mice. *European Journal of Immunology*, 25(9), 2551-2557.

Öztürk, R., F., Soysal, K. (1993). Altaş, Sperm kültüründe *Brucella melitensis* üretilen bir epididimoorşit bruselloz olgusu. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg*, 23(3) 148-50.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 6(2), 91–99.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6)

Pappas, G., Solera, J., Akritidis, N., & Tsianos, E. (2005). New approaches to the antibiotic treatment of brucellosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(2), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.06.001>

Parratt, D., Nielsen, K H and White, R G. (1977). Radioimmunoassay of IgM, IgG, and IgA *Brucella* antibodies. *Lancet*. 8021.(1).1075-1078.

Pérez-Etayo, L., de Miguel, M. J., Conde-Álvarez, R., Muñoz, P. M., Khames, M., Iriarte, M., Moriyón, I., & Zúñiga-Ripa, A. (2018). The CO₂-dependence of *Brucella ovis* and *Brucella abortus* biovars is caused by defective carbonic anhydrases. *Veterinary Research*, 49(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0583-1>

Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2000). Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes and Infection*, 2(7), 829–835. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)90368-x](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)90368-x)

Pliyev, B. K., Kalintseva, M. V., Abdulaeva, S. V., Yarygin, K. N., & Savchenko, V. G. (2014). Neutrophil microparticles modulate cytokine production by natural killer cells. *Cytokine*, 65(2), 126–129. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.11.010>

Porro, C., Di Gioia, S., Trotta, T., Lepore, S., Panaro, M. A., Battaglino, A., ... & Conese, M. (2013). Pro-inflammatory effect of cystic fibrosis sputum microparticles in the murine lung. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(6), 721-728.

- Quah, B. J., & O'Neill, H. C. (2007). Mycoplasma contaminants present in exosome preparations induce polyclonal B cell responses. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(5), 1070–1082. <https://doi.org/10.1189/jlb.0507277>
- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Baeza G, Morata P. Comparison between LightCycler Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 2005, 40: 260-4.
- Queipo-Ortuno, M.I., Morata, P., Dcon, P., Manchado, P., Colmenero, DJ. (1997). Rapid diagnosis of Human brucellosis by peripheral blood PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2929-2930.
- Rahman, M., Uddin, M., Park, J., Chae, J., Rahman, M., & Islam, M. (1970). A Short History of Brucellosis: Special Emphasis in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.3329/bjvm.v4i1.1517>
- Rautou, P. E., Vion, A. C., Amabile, N., Chironi, G., Simon, A., Tedgui, A., and Boulanger, C. M. (2011) Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ. Res.* 109, 593–606
- Refai, M., (2002). Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet. Microbiol.*, 90: 81-110.
- Ren, Y., Xie, Y., Jiang, G., Fan, J., Yeung, J., Li, W., Tam, P. K. H., & Savill, J. (2008). Apoptotic Cells Protect Mice against Lipopolysaccharide-Induced Shock. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4978-4985. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4978>
- Roitt, I., Brostoff, J., & Male, D. (2001). *Immunology*. London: Mosby.
- Rieber, N., Brand, A., Hector, A., Graepler-Mainka, U., Ost, M., Schäfer, I., et al. (2013). Flagellin induces myeloid-derived suppressor cells: implications for Pseudomonas aeruginosa Infection in Cystic Fibrosis Disease. *J. Immunol.* 190, 1276–1284. doi: 10.4049/jimmunol.1202144
- Rigby, C. E., & Fraser, A. D. (1989). Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in *Brucella abortus*. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, 53(3), 326–330.
- Risitano, A., Beaulieu, L. M., Vitseva, O., & Freedman, J. E. (2012). Trombosit-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood*, 119(26), 6288–6295. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-396440>
- Rodrigues, M., Fan, J., Lyon, C., Wan, M., & Hu, Y. (2018). Role of Extracellular Vesicles in Viral and Bacterial Infections: Pathogenesis, Diagnostics, and Therapeutics. *Theranostics*, 8(10), 2709–2721. <https://doi.org/10.7150/thno.20576>
- Ruiz-Castafieda, M. (1954). *Brucellosis*, 2nd edn, Prensa Medica Mexicana, Mexico, pp. 183-204

- Russell, R. S., Ryans, K., Huang, M., Omosun, Y., Khan, M., Powell, M. D., Igietseme, J. U., & Eko, F. O. (2018). Chlamydia Infection-derived Exosomes Possess Immunomodulatory Properties Capable of Stimulating Dendritic Cell Maturation. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 25(1), 1-15. <https://doi.org/10.9734/JAMMR/2018/38821>
- Saiz, M. L., Rocha-Perugini, V., & Sánchez-Madrid, F. (2018). Tetraspanins as Organizers of Antigen-Presenting Cell Function. *Frontiers in Immunology*, 9, 1074. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01074>
- Salmeron, I., Rodriguez-Zapata, M., Salmeron, O., Manzano, L., Vaquer, S., & Alvarez-Mon, M. (1992). Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis. *Clinical infectious diseases*, 15(5), 764-770.
- Saravi, M. A., Wright, P. F., Gregoret, R. J., & Gall, D. E. J. (1995). Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 47(1-2), 93-99.
- Satoskar, A. R., Stamm, L. M., Zhang, X., Okano, M., David, J. R., Terhorst, C., & Wang, B. (1999). NK cell-deficient mice develop a Th1-like response but fail to mount an efficient antigen-specific IgG2a antibody response. *The Journal of Immunology*, 163(10), 5298-5302.
- Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P., & Smith, V. L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO reports*, 16(1), 24–43. <https://doi.org/10.15252/embr.201439363>
- Seyman, D., Asik, Z., Sepin-Ozen, N., & Berk, H. (2015). Acute Brucellosis Following Accidental Exposure to *Brucella melitensis* Rev 1 Vaccine. *The West Indian Medical Journal*, 65(1), 216–218. <https://doi.org/10.7727/wimj.2014.348>
- Shen, G., Krienke, S., Schiller, P., Nießen, A., Neu, S., Eckstein, V., Schiller, M., Lorenz, H. M., & Tykocinski, L. O. (2017). Microvesicles released by apoptotic human neutrophils suppress proliferation and IL-2/IL-2 receptor expression of resting T helper cells. *European Journal of Immunology*, 47(5), 900–910. <https://doi.org/10.1002/eji.201546203>
- Shinozawa Y, Matsumoto T, Uchida K, Tsujimoto S, Iwakura Y, Yamaguchi K. 2002. Role of interferon-gamma in inflammatory responses in murine respiratory infection with *Legionella pneumophila*. *J Med Microbiol.* 51:225–230. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-3-225>
- Singh, P. P., Smith, V. L., Karakousis, P. C., & Schorey, J. S. (2012). Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells in vitro and in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(2), 777–785. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103638>

Skabytska, Y., Wolbing, F., Gunther, C., Koberle, M., Kaesler, S., Chen, K. M., et al. (2014). Cutaneous innate immune sensing of Toll-like receptor 2-6 ligands suppresses T cell immunity by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Immunity* 41, 762–775. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.009

Skendros, P., & Boura, P. (2013). Immunity to brucellosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 32(1), 137–147. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2190>

Skendros, P., Pappas, G., & Boura, P. (2011). Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes and Infection*, 13(2), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.10.015>

Solera, J., Martínez-Alfaro, E., & Espinosa, A. (1997). Recognition and optimum treatment of brucellosis. *Drugs*, 53(2), 245–256. <https://doi.org/10.2165/00003495-199753020-00005>

Sözen TH. (1996), Bruselloz. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doganay M., *İnfeksiyon Hastalıkları*, Ankara Nobel Tıp Kitapevleri, 486-491.

Starr, T., Ng, T. W., Wehrly, T. D., Knodler, L. A., & Celli, J. (2008). *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00718.x>

Street, J. M., Koritzinsky, E. H., Glispie, D. M., Star, R. A., & Yuen, P. S. (2017). Urine Exosomes: An Emerging Trove of Biomarkers. *Advances in Clinical Chemistry*, 78, 103–122. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.07.003>

Sümerkan B. (2008). *Brucella* Türleri. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, Eds. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. Baskı, Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, 2237-2243

T.C. Sağlık Bakanlığı, (2015). Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Brusellozun Mikrobiyolojik Tanısı.

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Dairesi Başkanlığı (2017). *Bruselloz İstatistik verileri*. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Dairesi Başkanlığı.

Tafelmeier, M., Fischer, A., Orsó, E., Konovalova, T., Böttcher, A., Liebisch, G., Matysik, S., & Schmitz, G. (2017). Mildly oxidized HDL decrease agonist-induced trombosit aggregation and release of pro-coagulant trombosit extracellular vesicles. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 169, 176–188. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.05.003>

Thery, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep*, 3, 15. <https://doi.org/10.3410/B3-15>

Thurlow, L. R., Hanke, M. L., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S. H., et al. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and

attenuate inflammation in vivo. *J. Immunol.* 186, 6585–6596. doi: 10.4049/jimmunol.1002794

Tian, G., Zhan, Z., Zhang, A., Zhao, H., Xia, X., He, Z., ... & Jiang, H. (2019). A case report on mother-to-child transmission of *Brucella* in human, China. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1-4.

Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), 1244–1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>

Tung, K. H., Ernstoff, M. S., Allen, C., & Shu, S. (2019). A Review of Exosomes and their Role in The Tumor Microenvironment and Host-Tumor "Macroenvironment". *Journal of Immunological Sciences*, 3(1), 4–8. <https://doi.org/10.29245/2578-3009/2019/1.1165>

Verger, J. M., Grayon, M., Tibor, A., Wansard, V., Letesson, J. J., & Cloeckaert, A. (1998). Differentiation of *Brucella melitensis*, *B. ovis* and *B. suis* biovar 2 strains by use of membrane protein-or cytoplasmic protein-specific gene probes. *Research in microbiology*, 149(7), 509-517.

Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(7), 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.017>

Von Loewenich, F. D., Scorpio, D. G., Reischl, U., Dumler, J. S., & Bogdan, C. (2004). Frontline: Control of *Anaplasma phagocytophilum*, an obligate intracellular pathogen, in the absence of inducible nitric oxide synthase, phagocyte NADPH oxidase, tumor necrosis factor, Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4, or the TLR adaptor molecule MyD88. *European Journal of Immunology*, 34(7), 1789-1797.

Wang, X. H., & Jiang, H. (2020). *Zhonghua liu xing bing xue za zhi* = Global prevalence of human brucellosis, 41(10), 1717–1722. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112338-20191022-00751>

Wang, Y., Tian, J., Tang, X., Rui, K., Tian, X., Ma, J., Ma, B., Xu, H., Lu, L., ,& Wang, S. (2016). Exosomes released by granulocytic myeloid-derived suppressor cells attenuate DSS-induced colitis in mice. *Oncotarget*, 7(13), 15356–15368. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7324>

Wang, Y., Zhang, Y., Cai, G., & Li, Q. (2020). Exosomes as Actively Targeted Nanocarriers for Cancer Therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 4257–4273. <https://doi.org/10.2147/IJN.S239548>

Watarai, M. (2004). Interaction between *Brucella abortus* and cellular prion protein in lipid raft microdomains. *Microbes and Infection*, 6(1), 93-100.

- Webb, J. L., & Webb, A. M. (1948). A first record of *Brucella abortus* (Bang) in the cattle of Mauritius; and data on the possible occurrence locally of undulant fever in man. *The Journal of Hygiene*, 46(4), 419–421. <https://doi.org/10.1017/s0022172400036585>
- WHO (1998). The development of new/Improved brucellosis vaccines. *Report of a WHO meeting*. Geneva, Switzerland 11-12 Dec 1997.
- Winn, W. C., & Koneman, E. W. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Wolf P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*, 13(3), 269–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>
- Wyatt H. V. (2013). Lessons from the history of brucellosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 32(1), 17–25. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2181>
- Xavier, M.N., Costa, E.A., Paixão, T.A., & Santos, R. (2009). The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciencia Rural*, 39, 2252-2260.
- Yaylı, G. (2003). Brusellozun Laboratuvar Tanısında Sorunlar. *XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, İstanbul*, 211-3.
- Yi, J., Wang, Y., Zhang, H., Deng, X., Xi, J., Li, H., ...Chen, C. (2021). Interferon-Inducible Transmembrane Protein 3-Containing Exosome as a New Carrier for the Cell-to-Cell Transmission of Anti-*Brucella* Activity. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 642968. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.642968>
- Young, E. J., Borchert, M., Kretzer, F. L., & Musher, D. M. (1985). Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Infectious Diseases*, 151(4), 682-690.
- Yumuk, Z., & O'Callaghan, D. (2012). Brucellosis in Turkey -- an overview. *Int J Infect Dis*, 16(4), e228-235. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.12.011>
- Zaborowski, M. P., Balaj, L., Breakefield, X. O., & Lai, C. P. (2015). Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*, 65(8), 783–797. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv084>
- Zhan, Y., Yang, J. and Cheers, C. Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella abortus* infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Infect. Immun.* 1993 b ; 61 : 2841 – 2847.
- Zhan, Y. I. F. A. N., & Cheers, C. H. R. I. S. T. I. N. A. (1993). Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. *Infection and Immunity*, 61(11), 4899.

- Zhang, H. G., Liu, C., Su, K., Yu, S., Zhang, L., Zhang, S., ...Kimberly, R. P. (2006). A membrane form of TNF-alpha presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(12), 7385–7393. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7385>
- Zhang, W., Jiang, X., Bao, J., Wang, Y., Liu, H., & Tang, L. (2018). Exosomes in Pathogen Infections: A Bridge to Deliver Molecules and Link Functions. *Frontiers in Immunology*, 9, 90. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00090>
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience*, 9(1), NA.
- Zhao, Y., Wu, T., Shao, S., Shi, B., ,& Zhao, Y. (2015). Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*, 5(2), e1004983. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1004983>
- Zhu, D., Tian, J., Wu, X., Li, M., Tang, X., Rui, K., ...Wang, S. (2019). G-MDSC-derived exosomes attenuate collagen-induced arthritis by impairing Th1 and Th17 cell responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865(12), 165540. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165540>

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

- °C: Santigrad derece
µm: Mikrometre
AHÖ: Akan Hücre Ölçer
ASH: Antijen Sunan Hücre
BCA: Bikinkoninik Asit Yöntemi
BCG: Bacillus Calmette-Guérin
BCV: *Brucella*-Containing Vacuole
BSA: Sığır Serum Albumini
BvfA: *Brucella* virülans faktörü A
BvrR: *Brucella* virülans ilişkili düzenleyici sistem
BvrS: *Brucella* virülans ilişkili sensör sistem
c-ELISA: Kompetitif Enzim Bağlı İmmüno-sorbent Analizi
CGT: Kompleman Fiksasyon Testi
CO₂: Karbondioksit
DNA: Deoksiribonükleik asit
ELISA: Enzim bağlı immüno-sorbent analizi
ER: Endoplazmik retikulum
ESCRT: Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
EV: Ekstrasellüler vezikül
fMLP: N-formilmetiyonil-lösil-fenilalanin
FPA: Floresan Polarizasyon Testi
G-MDSC: Granülositik Miyeloid Kökenli Süpressör Hücreler
GPO: **Glikozilfosfatidilinositol**
GTPaz: Guanozintrifosfataz
HSGM: Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü
HSP: Isı Şok Proteini
IEC: Bağırsak Epitel Hücresi
IFITM3: Anti-İnterferon-Endüklenebilir-Transmembran Protein 3
IFN-γ: İnterferon gama
Ig: İmmüoglobülin
LAMP: Loop-mediated Isothermal Amplification
LAMP-1: Lizozom ile İlişkili Membran Proteini 1
LPS: Lipopolisakkarit
MDSC: Miyeloid Kökenli Süpressör Hücreler
MHC: Majör Histokompabilite Kompleksi
miRNA: Mikro Ribonükleik asit
ml: Mililitre
MLVA: Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis
M-MDSC: Monositik Miyeloid Kökenli Süpressör Hücreler
MÖ: Milattan önce
MV: Mikrovezikül
NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NK: Doğal öldürücü hücre
NKT: Doğal Öldürücü T hücre
Omp25: Outer-membrane protein 25

P-EV: Trombosit kökenli ekstrasellüler vezikül
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RGPT: Rose Bengal Lam Testi
R-LPS: *Rough* liposakkarit
RNA: Ribonükleikasit
SAT: Serum Tüp Aglutinasyon Testi
SEM: Scanning Electron Microscope
S-LPS: *Smooth* lipopolisakkarit
SPOT: Lam Aglutinasyon Testi
Th: T *helper* (yardımcı T hücre)
Th1: Yardımcı T hücre 1
THSK: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
TNF- α : Tümör nekroz faktör-alfa
Treg: T regülatör hücre
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
 $\gamma\delta$ T: Gamma-delta T hücre
 μ l: Mikrolitre

8. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin başlangıcından itibaren desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, büyük bir sabırla beni çalışmaya ve öğrenmeye teşvik eden, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Ferah BUDAK'a,

Akademik eğitimim boyunca katkı ve desteğini her zaman hissettiğim, öğrencilerine her daim yeni ufuklar açan İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL'a,

Bu tez çalışmasında, eksozomların izole edilmesinde değerli tecrübeleri ve önemli katkılarından ötürü Dr. Salih Haldun BAL'a ve eksozomların elektron mikroskopu altında incelenmesinde değerli katkılar sunan Doç. Dr. Özer YILMAZ'a

Bu tez çalışmasındaki bruselloz vakalarına ait örneklerin toplanmasında değerli yardımlarından ve göstermiş oldukları katkı ve desteklerinden ötürü Prof. Dr. Emin Halis AKALIN ve Dr. Pınar HIZ ELLERGEZEN'e

Eğitimim boyunca beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum, akademik bilgisi ve yüksek hoşgörüsüyle beni hep daha ileriye götüren, yanımda olması güven veren değerli arkadaşım Muhammed Ali KIZMAZ'a

Bu çalışmanın her türlü aşamasında çok değerli katkıları olan, bilgi birikimi ve kıymetli deneyimlerine çok saygı duyduğum Deniz GÜLKAYA'ya ve her daim yanıbaşımdaya ve katkı sunmaya hazır bekleyen başta Figen AYMAK olmak üzere tüm İmmünoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma,

Desteklerini her zaman hissettiğim, her koşulda yanımda olan, gösterdikleri büyük sevgi, anlayış ve fedakârlık için canım annem, babam, ablam ve kardeşime,

Teşekkür ederim.

Abdurrahman Şimşek

Haziran 2021

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Abdurrahman Şimşek

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu :

2019 -

Bursa Uludağ Üniversitesi

Tıp-İmmünoloji Prog. Yüksek Lisans Eğitimi

2012 - 2016

İstanbul Okan Üniversitesi

Genetik ve Biyomühendislik (Tam Burslu) Lisans Eğitimi

Başarılar :

2020

En İyi Poster Sunum Ödülü (25. Ulusal İmmünoji Kongresi)

Budak F., Çagan E., Kızmaz M.A., **Şimşek A.**, Dombaz F., Tezcan G..., Oral B. *COVID-19 enfeksiyonlarında regülatör B (Breg) hücrelerinin ve B hücre bitkinliğinin (exhaustion) rolünün değerlendirilmesi*

Bildiriler:

2020

Sözlü Sunum

25. Ulusal İmmünoloji Kongresi

Ermış D.Y., Dombaz F., Kızmaz M.A., **Şimşek A.**, Çagan E., Asan A., Bal H., Karaçay M., Etgü O., Karaca M., Arslan G., Pınar I.E., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B. *COVID-19 pozitif hastalarda matür monosit ve/veya nötrofil alt-tipleri ve immatür pmn-mdsc, m-mdsc ve/veya e-mdsc-benzeri alt-gruplarının incelenmesi ve hastalık düzeyi ile değişimlerin değerlendirilmesi*

2020

Poster Sunum

25. Ulusal İmmünoloji Kongresi

Kızmaz M.A., Çagan E., **Şimşek A.**, Dombaz F., Tezcan G., Asan A., Demir H.I., Bal H., Ermış D.Y., Coşkun N.F., Akalın E.H., Oral H.B. ve Budak F. *Sitotoksik t lenfosit alt gruplarının COVID-19 hastalık şiddeti ile ilişkisi*

Budak F., Çagan E., Kızmaz M.A., **Şimşek A.**, Dombaz F., Tezcan G., Asan A., Bal H., Ermış D.Y., Demir H.I., Ediger D., Yılmaz E., Akalın E.H., Oral H.B. *COVID-19 enfeksiyonlarında regülatör B (Breg) hücrelerinin ve B hücre bitkinliğinin (exhaustion) rolünün değerlendirilmesi*

Şimşek A., Kızmaz M.A., Hız Ellergezen P., Bal H., Akalın E.H., Oral H.B., Yılmaz Ö., Budak F. *Brusellozlu hastalarda eksozom profilinin değerlendirilmesi*

Simsek A., Çagan E., Kızmaz M.A., Dombaz F., Tezcan G., Asan A., Demir H.I., Bal H., Ermiş D.Y., Demirdöğen E., Heper Y., Akalın E.H., Oral H.B. ve Budak F. *COVID-19 immünopatogeneğinde Th22, Tc22 ve Tc17 hücrelerinin önemi*

Çagan E., **Simsek A.**, Kızmaz M.A., Dombaz F., Tezcan G., Asan A., Demir H.I., Bal H., Ermiş D.Y., Görek Dilektaşlı A., Kazak E., Akalın E.H., Oral H.B. ve Budak F. *CD39 ekspresyon eden t regülator (Treg) hücrelerinin, COVID-19 immünopatogeneğindeki rolü*

Ermiş D.Y., Karaçay M., Eteü O., Karaca M., Arslan G., Dombaz F., Kızmaz M.A., **Simsek A.**, Çagan E., Asan A., Pınar I.E., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B. *COVID-19 pozitif hastalardaki granülositik benzeri miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin (pmn-mkbh) baskılama kapasite farklılıklarının araştırılması*

Ermiş D.Y., Arslan G., Karaçay M., Karaca M., Dombaz F., Eteü O., Kızmaz M.A., **Simsek A.**, Çagan E., Asan A., Pınar I.E., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B. *COVID-19 pozitif hastaların farklı yaş grubu dağılımındaki hücre proliferasyonlarının değerlendirilmesi*

Ermiş D.Y., Eteü O., Dombaz F., Karaçay M., Pınar I.E., Kızmaz M.A., **Simsek A.**, Çagan E., Asan A., Karaca M., Arslan G., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B. *SARS-CoV2 ilişkili immün yanıtta periferik kan miyeloid seri hücrelerinin olgunlaşma düzeyleri, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Nitrik Oksit (NO) üretim kapasitesi*

2014

9. Moleküler Biyoteknoloji Bahar Okulu

Simsek A., Cıbıkcı D., Sanlı, E., “RNA Interference: miRNA, shRNA and siRNA”, Karadeniz Technical University 9. Molecular Biotechnology Spring School, May 2014 , Trabzon-Turkey.