



T.C.
BURSA ULUDAĞ
ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ
(İMMÜNOLOJİ) ANABİLİM
DALI



**İMMÜNOMODÜLATÖR ÖZELLİKTEKİ YENİ SİTOKİNLERİN
BRUSELLOZ ENFEKSİYONLARINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Pınar HIZ

DOKTORA TEZİ

BURSA-2019

Pınar HIZ

MİKROBİYOLOJİ (İMMÜNOLOJİ) ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2019



**T.C.
BURSA ULUDAĞ
ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ
(İMMÜNOLOJİ) ANABİLİM
DALI**



**İMMÜNOMODÜLATÖR ÖZELLİKTEKİ YENİ SİTOKİNLERİN
BRUSELLOZ ENFEKSİYONLARINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Pınar HIZ

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Ferah BUDAK

DDP(T)-2017/13 - BAP

BURSA-2019

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

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum “**İmmünomodölatör Özellikteki Yeni Sitokinlerin Bruselloz Enfeksiyonlarında 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.

**Pınar HIZ
İmza**

BURSA SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıp-Mikrobiyoloji (İmmünoloji) Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Pınar HIZ tarafından hazırlanan “İmmünomodülatör Özelliğindeki Yeni Sitokinlerin Bruselloz Enfeksiyonlarında Değerlendirilmesi” konulu Doktora tezi günü,saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Tez Danışmanı	Prof. Dr. Ferah BUDAK
Üye	Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL
Üye	Prof. Dr. Halis AKALIN
Üye	Prof. Dr. Günnur Deniz
Üye	Doç. Dr. İshak Özel Tekin

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

.....

Adı Soyadı: Pınar HIZ

Anabilim Dalı: Tıp-Mikrobiyoloji (İmmünoloji)

Tez Konusu: İmmünomodülatör Özellikteki Yeni Sitokinlerin Bruselloz Enfeksiyonlarında Değerlendirilmesi

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

DANIŞMAN ONAYI

Ünvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Ferah BUDAK

İmza:

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK	
ETİK BEYAN	II
KABUL ONAY	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V-VII
TÜRKÇE ÖZET	VIII
İNGİLİZCE ÖZET	IX
1. GİRİŞ	1-3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tanım	4
2.2. Tarihçe	4
2.3. Sınıflandırma	5
2.4. Yapısal Özellikler	5-9
2.5. Genetik Özellikler	9-10
2.6. Hastalığın İnsanlara Bulaşma Yolları	10
2.6.1. Sindirim Yolu	10
2.6.2. Deri ve Mukoza Yolu (Direkt Temas)	10
2.6.3. Solunum Yolu	10
2.6.4. Cinsel Yolla Geçiş	10
2.6.5. Diğer	11
2.7. Klinik Bulgular	11
2.8. Komplikasyonlar	11-12
2.8.1. İskelet Sistemi	12
2.8.2. Sinir Sistemi	12
2.8.3. Kardiyovasküler Sistem	13
2.8.4. Gastrointestinal Sistem	13
2.8.5. Hematopoetik Sistem	13
2.8.6. Genitoüriner Sistem	14
2.8.7. Diğer Sistemler	14
2.9. Tanıda Kullanılan Yöntemler	14
2.9.1. Kültür	14-15
2.9.2. Serolojik Tanı	15-16
2.9.2.1. ELISA	16
2.9.3. Moleküler Tanı	16
2.9.3.1. PCR	16-18
2.10. Tedavi	19
2.11. <i>Brucella</i> Patogenezi	20-22
2.12. Brusellozda İmmün Yanıt	22
2.12.1. Brusellozda Doğal İmmün Yanıt	22
2.12.1.1. Epitelyal Bariyerler	22-23
2.12.1.2. Toll-Benzeri Reseptörler (TLRs)	23-24
2.12.1.3. Fagositer Hücreler	24-25
2.12.1.4. Doğal Lenfoid Hücreler (ILCs)	26-27
2.12.1.5. Antijen Sunan Hücreler (ASH)	28-29
2.12.1.6. Sınırlı Antijen Reseptör Çeşitliliği Olan Hücreler	29-31
2.12.2. Brusellozda Edinsel İmmün Yanıt	31

2.12.2.1. Hümorale İmmün Yanıt.....	31-32
2.12.2.2. Hücresele İmmün Yanıt.....	32-36
2.12.3. Regülatör T (Treg) Hücre/ Th17 Hücre Dengesi.....	37
2.12.4. Bruselloz ve Otofaji.....	37-38
2.12.5. Bruselloz ve Apoptoz.....	38-39
2.13. Sitokinler.....	39
2.13.1. Genel Özellikler.....	39-41
2.13.2. Sınıflandırma.....	41
2.13.3. Pro-enflamatuvar Sitokinler.....	42
2.13.3.1. İnterlökin 36 (IL-36).....	42-43
2.13.3.2. İnterlökin 39 (IL-39).....	43-44
2.13.4. Anti-enflamatuvar Sitokinler.....	44
2.13.4.1. İnterlökin 35 (IL-35).....	44-46
2.13.4.2. İnterlökin 37 (IL-37).....	46-47
2.13.4.3. İnterlökin 38 (IL-38).....	47-48
2.14. İnterferonlar.....	48-49
2.15. Kemokinler	49-50
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	51
3.1. Periferik Kanda Sitokin Düzeylerinin Saptanması.....	51-53
3.2. PKMH’de Sitokinlerin Gen Ekspresyon Düzeylerinin Saptanması.....	54
3.2.1. PKMH İzolasyonu.....	54
3.2.2. RNA İzolasyonu.....	54-55
3.2.3. cDNA İzolasyonu.....	55-57
3.2.4. RT-PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyonlarının Tayini.....	57-60
3.3. İstatistiksel Analiz.....	60
4. BULGULAR.....	61
4.1. Ekstrasellüler Sitokin Düzeyleri.....	61-65
4.1.1. IL-35 Sitokin Düzeyi.....	65-66
4.1.2. IL-36 Sitokin Düzeyi.....	66-67
4.1.3. IL-37 Sitokin Düzeyi.....	67-68
4.1.4. IL-38 Sitokin Düzeyi.....	68-69
4.1.5. IL-39 Sitokin Düzeyi	69-70
4.1.6. Ekstrasellüler Sitokin Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	70-75
4.2. Moleküler (PCR) Yöntemler ile Elde Edilen Bulgular.....	76
4.2.1. Referans Gen ACTB RT-PCR Sonuçları	76-78
4.2.2. IL-35 RT-PCR Sonuçları.....	78
4.2.2.1. EBİ3 Gen Ekspresyonu.....	78
4.2.2.2. IL12A Gen Ekspresyonu.....	79
4.2.3. IL-36 RT-PCR Sonuçları.....	79
4.2.3.1. IL36G Gen Ekspresyonu.....	79
4.2.4. IL-37 RT-PCR Sonuçları.....	80
4.2.4.1. IL37 Gen Ekspresyonu.....	80
4.2.5. IL-38 RT-PCR Sonuçları.....	80
4.2.5.1. IL1F10 Gen Ekspresyonu	80
4.2.6. IL-39 RT-PCR Sonuçları	81
4.2.6.1. EBİ3 Gen Ekspresyonu	81
4.2.6.2. IL23A Gen Ekspresyonu.....	81
4.2.7. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması	81-82

5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	83-90
6. KAYNAKLAR	91-106
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	107-109
8. TEŞEKKÜR	110
9. ÖZGEÇMİŞ	111

ÖZET

Bruselloz dünya çapında yaygın olarak görülen zoonotik bir hastalıktır ve *Brucella* bakterisi ile konak arasındaki etkileşimler hastalığın seyri açısından oldukça önemlidir. Sitokinler anti-bakteriyel immünyetede rol oynayan önemli mediatörlerdir. Günümüzde tanımlanmış yeni sitokin grupları birçok farklı hastalık modelinde immünyomodülatör özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Bu yeni sitokin grupları ile bruselloz hastalığı arasındaki bağlantıya dair henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmanın amacı, yeni immünyomodülatör sitokin gruplarının (IL-35, IL-36, IL-37, IL-38, IL-39) *Brucella* enfeksiyonlarında değerlendirilmesi ve hastalığın kronikleşmeye gidişindeki etkilerinin incelenmesidir.

Bu çalışmada, yeni sitokin gruplarının (IL-35, IL-36, IL-37, IL-38, IL-39) bruselloz enfeksiyonundaki etkinliği, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Çalışma için, 40 sağlıklı kontrol, 40 akut ve 40 kronik bruselloz hastasından 20'şer ml kan örneği alınmıştır. Hasta ve sağlıklı kontrollerin serumlarındaki IL-35, IL-36, IL-37, IL-38 ve IL-39 sitokin seviyeleri *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yöntemi ile tespit edilmiştir. Periferik kan mononükleer hücre (PKMH)'lerinde ise bu sitokinleri belirleyen transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile çalışılmıştır.

Çalışmamızda her bir sitokin grubuna ait genlerin (Ebi3/IL-12A, IL-36G, IL-37, IL1F10, Ebi3/IL-23A) ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir farklılık saptanmazken, hem pro-enflamatuvar (IL-36, IL-39) hem de anti-enflamatuvar (IL-35, IL-37, IL-38) özellikteki sitokinlerin serum düzeylerinin, hasta gruplarında sağlıklı kontrollere oranla azaldığı görülmüştür. Bu durum *Brucella* bakterisinin bu sitokin gruplarının ekspresyonunu baskıladığını düşündürmektedir. IL-35 ve IL-37 sitokin seviyeleri kronik grupta akut gruba göre anlamlı olarak artmıştır. Anti-enflamatuvar özellikteki bu sitokinlerin kronik vakalarda artmış olması hastalığın kronikleşmeye gidişinde önemli rol oynayabileceklerini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Bruselloz, immünyomodülatör sitokin, akut, kronik

İNGİLİZCE ÖZET

EVALUATION OF IMMUNOMODULATORY NEW CYTOKINES IN BRUCELLOSIS INFECTIONS

Brucellosis is a common zoonotic disease worldwide and interactions between *Brucella* and host are very important for the course of the disease. Cytokines are important mediators involved in anti-bacterial immunity. Recently defined new cytokine groups have been evaluated in terms of immunomodulatory properties in many different disease models. There is no study on the relationship between these new cytokine groups and brucellosis. The aim of the study was to evaluate the new immunomodulatory cytokine groups (IL-35, IL-36, IL-37, IL-38, IL-39) in *Brucella* infections and to investigate the effects of the disease on the course of chronicity.

In this study, the effectiveness of new immunomodulatory cytokine groups (IL-35, IL-36, IL-37, IL-38, IL-39) in the process of *Brucella* infection was investigated by using serological and molecular methods. For this study, 20 ml each blood samples were taken from 40 healthy control, 40 acute and 40 chronic brucellosis patients. The control and patient groups were included in the study by taking into consideration the mean age and exclusion criteria in the consent form. IL-35, IL-36, IL-37, IL-38 and IL-39 cytokine levels in the sera of the patient and healthy controls were determined by ELISA. Expressions of the transcription factors determining these cytokines in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were studied by RT-PCR.

In our study, no significant difference was found in the expression levels of the genes of each cytokine group (Ebi3 / IL-12A, IL-36G, IL-37, IL1F10, Ebi3 / IL-23A). Serum levels of both pro-inflammatory (IL-36, IL-39) and anti-inflammatory (IL-35, IL-37, IL-38) cytokines were found to decrease in patient groups compared to healthy controls. This suggests that *Brucella* suppress the expression of these cytokine groups. IL-35 and IL-37 cytokine levels were significantly increased in the chronic group compared to the acute group. The increase in these anti-inflammatory cytokines in chronic cases suggests that they may play an important role in the progression of the disease to chronicity.

Key words: Brucellosis, immunomodulatory cytokine, acute, chronic

1.GİRİŞ

Bruselloz, *Brucella* cinsi bakterilerin neden olduğu, dünya çapında yaygın ve ülkemizde oldukça sık görülen bir zoonozdur. *Brucella* türleri 0.6-1.5 μm boyutunda gram negatif, hareketsiz, aerob, sporsuz kokobasillerdir. Hastalığın en belirgin bulaş yolları; sindirim sistemi, enfekte dokularla direkt temas ve inhalasyondur. Ülkemizde en çok çiğ süt ve çiğ sütten yapılmış ürünlerin tüketimi ile bulaşır. Yaş ve cinsiyete bağlı olmamakla birlikte, en sık 15-35 yaş aralığında gözlenmektedir (Aktug Demir, 2009).

Bruselloz mortalitesinin düşük olmasına rağmen belirtilerinin birçok hastalıkla karışmasından dolayı tanının g konabilmesi, tedavisinin uzun sürmesi ve kronikleşme özelliği gösterebilmesi hastalığın önemini arttırmaktadır. Hastalığın morbiditesinin yüksek olması nedeniyle hastalığa bağlı, insanlarda oluşan iç gücü kaybı ile tedavi giderlerinin yanısıra hayvanlarda meydana gelen verim düşüklüğü önemli ekonomik kayıp nedenleridir (Hayat, 2000).

Konaktaki birçok organ *Brucella* bakterisi tarafından etkilenebilir, bu yüzden hastalık çeşitli semptom ve bulgularla seyretmektedir. İnkübasyon süresi 1-5 hafta arasındadır. Bu süreyi takiben ateş, üşüme, titreme, halsizlik, bulantı, kusma, baş ağrısı, kas ağrısı, eklem ağrısı gibi özgül olmayan semptomlar meydana gelir. Subklinik veya asemptomatik enfeksiyon, akut enfeksiyon, subakut enfeksiyon, kronik enfeksiyon ve lokalize enfeksiyon olmak üzere beş klinik formu bulunmaktadır. oğaldığı dokularda meydana gelen mikroapseler, granülom odakları hastalığın kronikleşmesinde ve relapsında önemli rol oynar (Aktug Demir, 2009).

Bruselloz tanısı, kan, kemik iliği, karaciğer, lenf nodu, beyin omurilik sıvısı (BOS), sinovyal sıvı, prostatik sıvı veya diğer klinik örneklerden mikroorganizmanın izolasyonu ve/veya klinik bulgular varlığında serolojik testlerin pozitifliği ile konulur (Aktug Demir, 2009). Bruselloz tanısında olduğu kadar, tedavisinde de belli zorluklar yaşanmaktadır. Tedaviye rağmen hastalık yaklaşık % 10 oranında tekrar edebilir (Carbel, 2006). Tedavi edilmeyen *Brucella* enfeksiyonları kronikleşebilir ve hastanın şikayetleri yıllarca sürebilir. Genellikle ilk yıl içinde gelişen ve ilk enfeksiyondan daha hafif geçen relaps; oral tedavilerde % 4-24, oral-parenteral tedavilerde ise % 5-8 oranındadır (Franco ve ark., 2007).

Brucella türleri, bulunduğu hücrenin canlılığına etki etmeden replike olabilir (Aygen ve Doganay, 2003). Bulaştan sonra basil önce bağırsak mukozasını geçer, lenfatiklerden sonra kana ilerler ve bakteriyemiye sebep olur. Kan yoluyla daha çok retikuloendotelyal hücrelerin yoğun olduğu alanları işgal eder. Makrofajlar tarafından fagosite edilir. Makrofajın yıkıcı enzimlerinden hücre içindeki ortamı değiştirerek korunur. Bu değişikliği nasıl sağladığı çok iyi aydınlatılmamıştır; ancak bakterinin yüzeyindeki endotoksik olmayan lipopolisakkaritlerin (LPS) enflamatuvar sitokin üretimini engellemesi, majör histokompatibilite sınıf II (MHC-II) antijenlerinin sunumunu farklılaştırması ve enfekte hücrelerin apoptozunu bloke etmesi gibi özellikleri yüzünden bakterinin yaşamını devam ettirebildiği, üreyebildiği ve diğer dokuları işgale yöneldiği tahmin edilmektedir (Mantur ve ark., 2007). Mikroorganizmanın bu özelliklerinden dolayı hastalığın relapsa ve kronikleşmeye meyilli olduğu öngörülmüştür.

Brusellozun gelişiminde immün sistemin önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. T yardımcı (Th) hücreleri arasındaki denge bruselloza direnç veya duyarlılığın oluşmasında; sitokinler ise brusellozun patogenezinde önemli görevlere sahiptir (Galanakis ve ark., 2005). Farelerde yapılan çalışmalarda, brusellozda Tip 1 (Th1) hücreli immün yanıtın endüklendiği gözlenmiştir. Virülan türlerinin eliminasyonu Th1 tip immün yanıt aracılı makrofaj aktivasyonu ile gerçekleşir. Makrofajların aktivasyonunda rol oynayan temel sitokinler tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-12 (IL-12)'dir (Young, 2010).

Bu durum brusellozun gelişmesinde immün sistemin rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

Benzer özelliklere sahip hastalara aynı tedavi yöntemleri uygulanmasına rağmen hastaların büyük bir kısmı iyileşirken, bir kısmı kronikleşmekte, nadiren de relapslar gözlenmektedir. Bu klinik farklılıkların nedeni bilinmemektedir. Sitokinler bu konuda üzerinde araştırma yapılan önemli mediatörlerdir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda sitokinlerle akut ve kronik brusellozdaki klinik seyir ve relaps arasındaki bağlantı henüz netleşmemiştir. Güncel olarak 40'ın üzerinde sitokin tespit edilmiştir ancak son bulunanlar ile ilgili yeterli sayıda çalışma mevcut değildir.

Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi (Proje no: DDP(T)-2017/13) tarafından desteklenen bu tez çalışmasında, sağlıklı kontroller ile akut ve kronik brusellozlu hastalardan alınan periferik kandan ELISA metodu kullanılarak immünomodülatör özellikteki sitokinlerin (IL-35, IL-36, IL-37, IL-38 ve IL-39) serum düzeylerinin araştırılması ve RT-PCR yöntemi ile de PKMH'lerinde bu sitokinlere ait transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarının incelenmesi amaçlanmıştır. Böylece brusellozun takibinde immün değişiklikler açısından yeni kriterler elde edilmesi ve kronikleşmeye gidişteki etkilerini daha anlaşılır hale getirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

Bruselloz, hayvanlardan insanlara bulaşan ve gelişmekte olan ülkelerde hala endemik olarak görülen bir zoonozdur. Özellikle koyun, keçi, sığır, manda ve domuz gibi evcil hayvanları etkilemekte ve bu hayvanlardan insanlara direkt veya indirekt yollardan geçmektedir (Aygen ve Doganay, 2003).

2.2. Tarihçe

Bruselloza benzer klinik durumlar; MÖ 450 yıllarında Hipokrat tarafından bildirilmiştir ve 'humma' olarak tanımlanmıştır. Ancak bruselloz ilk kez 1861'de Marston tarafından Malta adasındaki İngiliz askerlerinde tespit edilmiştir. Hastalık etkeni 25 yıl sonra Bruce tarafından izole edilmiş ve *Micrococcus melitensis* olarak adlandırılmıştır (Aygen ve Doganay, 2003). 1897'de Hughes hastalığı "Malta humması" ve "dalgalı humma" olarak adlandırmış; yine aynı yıl Danimarkalı veteriner Bang sığırlarda düşük etkeni olarak *Bacillus abortus*'u göstermiştir (Sümerkan, 2008). Akdeniz Ateş Komisyonu 1904-1907 yılları arasında Malta'da bulunan keçilerin rezervuar olduğunu ve hastalığın hayvandan insana bulaşında taze keçi sütünün rol oynadığını açıklamıştır (Sümerkan, 2008). 1914'te ise Traum tarafından ölü doğan domuzdan *Brucella suis* izole edilmiştir (Celillo ve Gotuzzo, 1992).

Ülkemizde bruselloz ilk kez 1915 yılında Hüsamettin Kural ve Mahmut S. Akalın tarafından bildirilmiştir ve "koyun hastalığı" ya da "mal hastalığı" gibi isimlerle bilinmektedir (Sümerkan, 2008).

2.3. Sınıflandırma

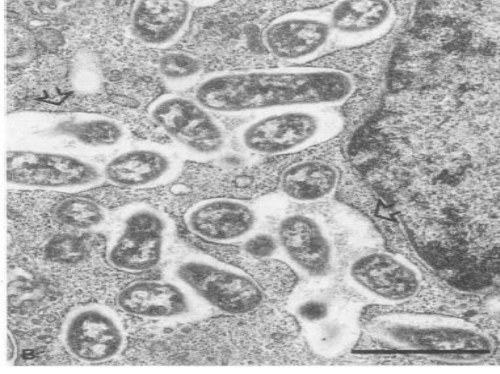
Brucella bakterileri Proteobacteriaceae'ların Alphaproteobacteria sınıfında Rhizobiales takımında Brusellaceae familyasında bulunurlar (Godfroid ve ark., 2011; Schurig ve ark., 2002). Günümüzde temel olarak konakçalarına ve antijenik karakterlerine göre belirlenmiş 10 *Brucella* türü bulunmaktadır: *Brucella melitensis* (keçi), *Brucella abortus* (sığır), *Brucella suis* (domuz), *Brucella canis* (köpek), *Brucella ovis* (koyun), *Brucella neotomae* (çöl faresi), *Brucella cetacea* (deniz memelisi), *Brucella pinnipedia* (fok), *Brucella microti* (tarla faresi) ve *Brucella inopinata* (konakçısı bilinmiyor) (Tablo 1). Bunların içerisinde insanlar için en patojenik olanlar; *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* türleridir (Corbell, 1997).

Tablo 1. *Brucella* türleri, biyotipleri ve konakçıları

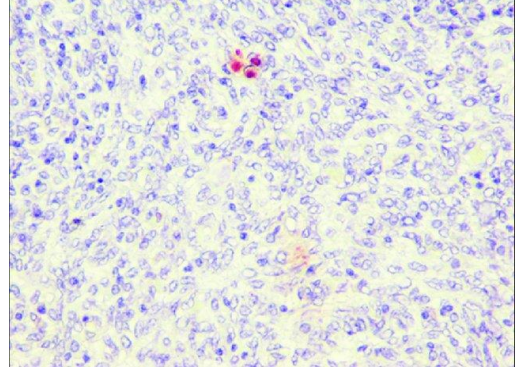
Türleri	Biyotipleri	Konakçılar
<i>B. melitensis</i>	1-3	Koyun, keçi
<i>B. abortus</i>	1-6,9	Sığır
<i>B. suis</i>	1,3	Domuz
	2	Vahşi domuz
	4	Tavşan
	5	Ren geyiği
<i>B. neotomae</i>	-	Kemirgenler
<i>B. ovis</i>	-	Ağaç faresi
<i>B. canis</i>	-	Koç
<i>B. ceti</i>	-	Köpek
<i>B. pinnipedialis</i>	-	Su memelileri
<i>B. microti</i>	-	Çöl faresi, tilki
<i>B. inopinata</i>	-	Bilinmiyor

2.4. Yapısal Özellikleri

Brucella türleri (Şekil1, 2) gram negatif kokobasil yapısında, hareketsiz ve aerobik mikroorganizmalardır. Bakterinin kapsül, spor veya flajelası yoktur. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan besiyerlerinde iyi üremezler. Üreme en iyi triptaz agarda veya 37°C'de serum dekstroz agarda gerçekleşir. Bazı *Brucella* türleri (*B. abortus*, *B. suis*) özellikle primer izolasyon için CO₂'ye ihtiyaç duyar (Aygen ve Doganay, 2003).

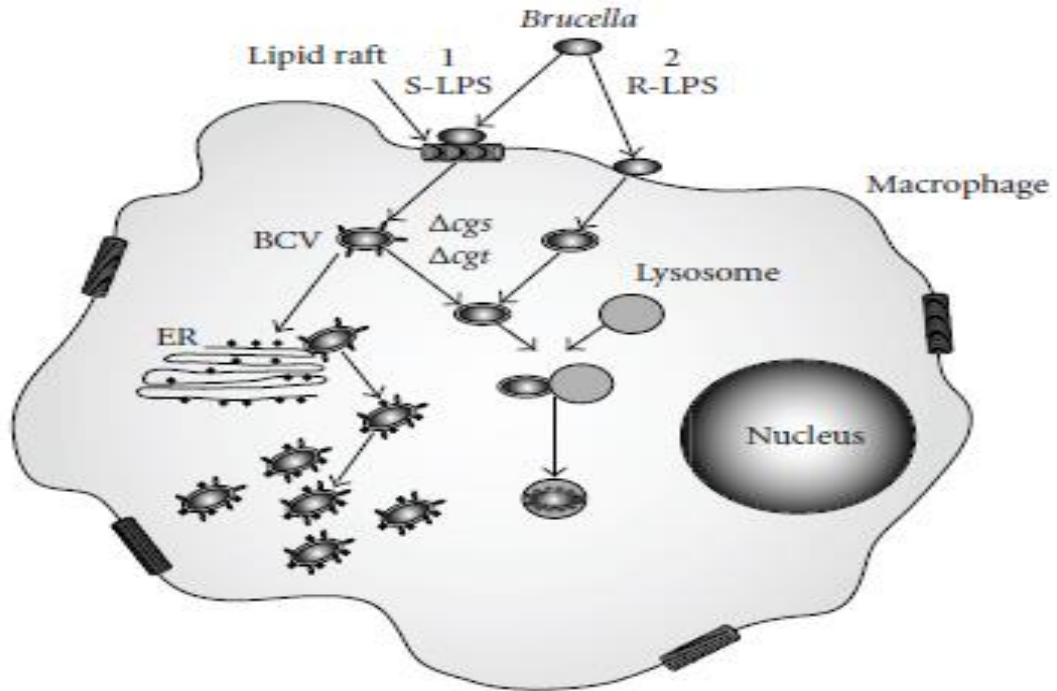


Şekil 1. *B. abortus* ile enfekte Vero hücrelerinin elektron mikroskobu görüntüsü (Detilleux ve ark., 1990)



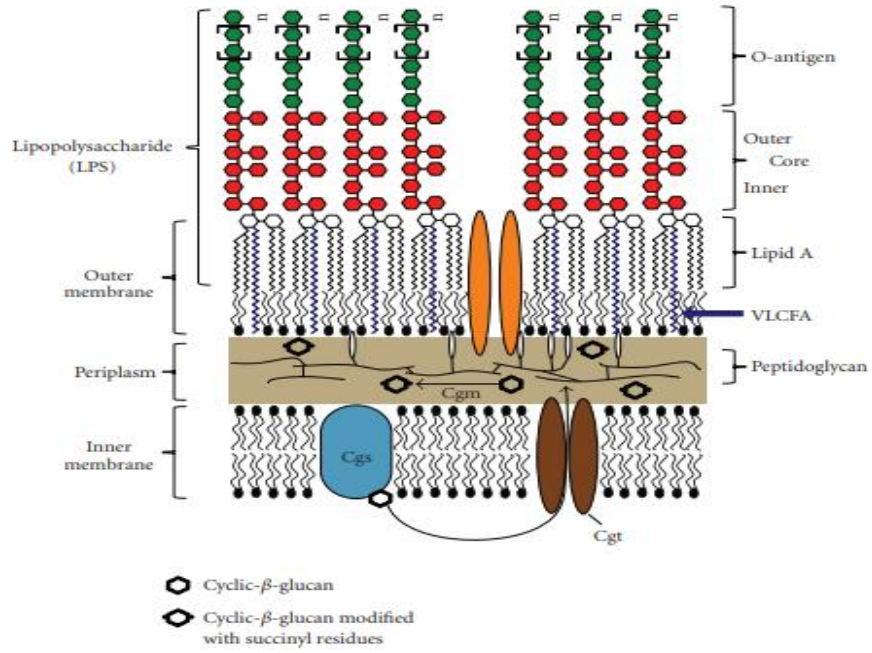
Şekil 2. *B. melitensis* pozitif uterus makrofajları (Beena ve ark., 2017)

Brucella bakterileri, enfekte etmek için daha çok makrofajlar gibi fagositik hücre tiplerini tercih ederler (Şekil 3). *Brucella* bakterisi fagozom içerisine alınarak replike olmak için ER'a ulaştırılır. Konak organizmasının immün sisteminden kaçışı ve bakterilerin replikasyon hedeflerinin olması, enfeksiyon sürecinin anahtar olgularıdır (Andreas ve ark., 2010).



Şekil 3. *Brucella*-makrofaj etkileşimi: S-LPS *Brucella* suşları, lipid raflarla etkileşerek hücreye girer ve membran tarafından sarılarak *Brucella* içeren vakuol (BCV) denen yapıyı oluşturur. Bu vakuol ER'a erişimi sağlayan bazı lipid raft markerlerini içerir. *Brucella*, ER ile birleşir ve böylece replikasyon başlamadan önce lizozom füzyonundan kaçınmak için ER markerleri edinir. R-LPS mutantları ise lipid rafları kullanmadan makrofajlara direkt ve hızlıca girer, lizozomu hedef alarak yok ederler (Andreas ve ark., 2010).

Bakteriyel hücre zarfı *Brucella* ve konak arasındaki etkileşimde temel noktadır. Bu zarf içerisindeki moleküler yapılar da enfeksiyon sürecinin önemli bir kısmını oluşturur. *Brucella* bakterisinin hücre zarfı iki membrandan oluşur. Dış membran, bakteri ve konağın karşılaştığı ilk etkileşim bölgesi olduğu için enfeksiyon sürecinde kritik bir rol oynar. Dış membranın dış tabakası üç ana komponent içeren LPS'den oluşur: i) lipid A, ii) iç ve dış kor bölgesi ve iii) O-antijeni.



Şekil 4. *Brucella* hücre zarfı yapısı (Andreas ve ark., 2010)

Ekstrasellüler bölgedeki O-antijen yüzeyi edinsel immün yanıtlar tarafından tanınır. O-antijeni farklı şeker gruplarından oluşan bir kor molekülüne bağlıdır. Lipid-A membrandaki LPS'nin hidrofobik kısmını oluşturur ve doymuş yağ asitleri ile asetillenmiş bir diaminoglukoz omurgası içerir. Ayrıca *Brucella* lipid-A'sı *very-long-chain-fatty acid* (VLCFA) denen bir molekülü de yapısında bulundurur. Siklik β -1, 2 glukanlar iç membran proteini Cgs tarafından sentezlenir ve Cgt ile periplazmaya taşınır; burada membran proteini Cgm aracılığıyla modifiye edilir (Cardoso ve ark., 2006).

Brucella bakterilerinin LPS tabakasında somatik M, A ve yüzeyel L antijenleri bulunur. *B. abortus* ve *B. suis*'de A antijeni fazla, M antijeni az bulunurken, *B. melitensis*'te M antijeni fazla, A antijeni azdır (Memish ve ark., 2001). *Brucella*

bakterisinin asıl virülan ve immüno-dominant antijeni S suşlarının lipopolisakkarit (S-LPS) yapısıdır. *Rough* tipi suşlarda virülans azalmıştır. Doğal R formundaki türler (*B. canis* ve *B. ovis*) konak savunmasına karşı daha dirençsizdir (Gorvel ve Moreno, 2002). Bunun yanında *Brucella* bakterilerinin *Salmonella* cinsi bakterilerde bulunan Vi antijenlerine benzer L antijenleri vardır. Bu antijen genelde *B. abortus* suşlarında olup yeni izole edilen bakterilerde bulunur ve aglütinasyona engel olmaktadır (Kurt ve Türkçapar, 2002).

B. melitensis, *B. abortus*, *B. suis* türleri; major yüzey antijeni olarak, O zinciri içeren somatik lipopolisakkarit (S-LPS) taşıdıklarında S, O zinciri bulunmayan *rough* lipopolisakkarit (R-LPS) varlığında ise R suşlar olarak ortaya çıkarlar. S-LPS en önemli virülans faktörüdür. S-LPS'nin yapısındaki O zinciri bakterinin hücre yüzeyinin en önemli antijenik yapısını oluşturur. Ayrıca enfekte konakta immüno-dominant olup, günümüzde S koloni yapan suşları tarafından oluşturulan enfeksiyonların serolojik tanısında major antijenik yapıdır (Bilgehan H, 2002; Garin ve ark., 2005).

Brucella bakterisinin dış membranı, LPS dışında major dış membran proteinlerini (DMP) de yapısında bulundurur. DMP, sodyum dodesil sulfat (SDS) ile ayrıştırılabilir (Cloekaert ve ark., 2002; Vizcaino ve ark., 2001). Mikroorganizmaların yüzeyinde koruyucu özelliğe sahip iki immünojenik yapı bulunmaktadır. Bunlar sodyum dodesil sulfat insolübl (SDS-I) hücre duvarı fraksiyonu ve sıcak tuzlu su (hot saline) ekstraktıdır (Kurt ve Türkçapar, 2002). *B. abortus*'un SDS-I fraksiyonu moleküler ağırlıkları 25-27 (Grup 3) ve 36-38 kDa (Grup 2) olan iki büyük membran proteini tarafından oluşturulur ve bu proteinler peptidoglikanla sıkıca bağlı halde bulunur. Grup 2 proteinleri, porin proteinleri olarak da adlandırılır (Vizcaino ve ark.,2001). *B. melitensis*'in SDS-I fraksiyonu yine peptidoglikanla sıkıca bağlı, 31-34 kDa (Grup 3) ağırlığında başka bir majör DMP içerir. DMP'lerin immünojenik özellikleri zayıftır ve kendilerine karşı heterojen bir antikor yanıtı oluşur. Bu türlerde temel immün yanıt S-LPS ile sağlanır (Cloekaert ve ark., 1995). *B. ovis* ve *B. canis* major yüzey antijeni olarak R-LPS taşıdıkları için R suşu olarak adlandırılırlar ve yüzeylerinde O zinciri taşımazlar. Grup 3 proteinlerinden özellikle 31-34 kDa ağırlığında olanlar, *B. ovis* enfeksiyonlarında kuvvetli bir antikor yanıtı oluştururlar (Bowden ve ark., 2000; Kittelberger ve ark., 1998). Yapılan çalışmalarda, 25-27 kDa ağırlığındaki dış

membran proteinlerinin *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis*'in virülansında görev aldığı da gösterilmiştir (Kittelberger ve ark., 1998).

Pürifikasyon çalışmalarının eksikliğinden dolayı tanısal testlerle ilgili çok az antijen moleküler düzeyde tanımlanabilmiştir. Aglütinasyon, kompleman fiksasyon, *Rose Bengal*, ring testi gibi standart testlerde rol oynayan major antijen S-LPS'dir. İmmünodiffüzyon ve immünoelektroforez testlerinde kullanılan intrasellüler A2 antijeni ise bazı durumlarda enfekte hayvanların aşılanmış olanlardan ayırt edilmesinde kullanılabilir (Bowden ve ark., 2000).

2.5. Genetik özellikleri

Brucella genomunun ortalama büyüklüğü $2,37 \times 10^9$ daltondur ve DNA'nın toplam guanin-sitozin içeriği % 58-59 mol'dür. Bütün *Brucella* türleri % 95 DNA homolojisi gösterir. *Brucella* genomu 2,1 ve 1,5 megabaz büyüklüğünde iki halkasal kromozom içerir. *Brucella* türlerinde doğal plazmidler gözlenmemiştir (Aktug Demir, 2009; Gorvel ve Moreno, 2002; Mantur ve ark., 2007).

Brucella bakterilerinde genetik transformasyon ve konjugasyonu ispat etme çalışmaları çoğu kez başarısızlıkla sonuçlanmasına rağmen, yakın geçmişte transdüksiyonun varlığına dair bazı bulgular elde edilmiştir. *Brucella* kültürlerinde genetik olarak tespit edilmiş varyasyonlar sık gözlenebilmektedir. S koloni fazından R koloni fazına kadar olan değişiklikler, CO₂ ihtiyacının kaybı veya H₂S yapımının kaybı, fajlar yoluyla olan lizise bağlı duyarlılıktaki değişiklikler, boya ve antibiyotiklere karşı direnç bu varyasyonlar içerisindedir. *Brucella* türündeki mikroorganizmaların DNA polinükleotid sekansı belirgin benzerlikler göstermektedir. DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ile bütün suşlar arasında % 96 ± 4 DNA ilişkisi gösterilmiştir.

Brucella genom araştırmalarında bakteri genomunun üç rRNA operonu içerdiği, iki tanesinin kromozom I üzerinde, üçüncüsünün ise kromozom II üzerinde olduğu belirlenmiştir. Tip IV sekresyon sistemi için kromozom II'de kodlanan 12 açık okuma bölgesi bulunmaktadır. *Brucella* bakterisinin hücre içi trafiğinin düzenlenmesi için *Brucella* tip IV sekresyon sistemini kodlayan VirB operonuna ihtiyaç vardır. Bakteriyel yüzeydeki LPS molekülünün bütünlüğü de hücre içi yaşam ve sonrasında

virülans için gerekli faktörlerden biridir (Boschiroli ve ark., 2002; DelVecchio ve ark., 2002).

2.6. Hastalığın İnsanlara Bulaşma Yolları

2.6.1. Sindirim yolu

Kontamine et, süt ve süt ürünlerinin sindirim yolu ile alınması en sık karşılaşılan bulaşma yoludur. Pastörize edilmemiş süttten yapılan peynir, krema ve yağ en önemli enfeksiyon kaynaklarıdır.

2.6.2. Deri ve mukoza yolu (direkt temas)

Enfekte hayvanın doku, kan ve plasentası veya enfekte laboratuvar materyalinin, hasarlanmış deri, mukoza veya konjonktivaya teması ile bulaşma gerçekleşebilir.

2.6.3. Solunum yolu

Enfeksiyöz aerosollerin inhalasyonu ile bulaş gerçekleşir. Bu şekildeki bulaş yolu, laboratuvar çalışanları, çiftçiler, hayvan bakıcıları, mezbaha çalışanları ve kasaplar için risk oluşturmaktadır. *Brucella* türleri aerosoller aracılığıyla oldukça enfeksiyöz hale gelebildiği için günümüzde potansiyel biyolojik savaş ajanları olarak da kullanılmaktadır.

2.6.4. Cinsel yolla geçiş

Cinsel yolla geçiş kesin olarak bildirilmemesine rağmen, enfekte insanların semenlerinde *Brucella* bakterileri üretilmiş ve potansiyel bir risk faktörü olduğu gözlenmiştir.

2.6.5. Diğer

Bahsedilen bulaş yolları dışında, kan transfüzyonu, kemik iliği/doku nakli ve anneden bebeğe plasenta aracılığıyla geçebilmektedir (Carbel, 2006; Sümerkan, 2008; Young, 2005).

2.7. Klinik Bulgular

Bruselloz vücutta herhangi bir organ sisteminin tutulabildiği sistemik bir hastalıktır. Başlangıç sessiz veya akut olabilir, genelde inokülasyondan sonraki 2-4 hafta içerisinde semptomlar başlar. Semptomların süresine göre hastalık akut (<8 hafta), subakut (8-52 hafta) veya kronik (>1 yıl) olarak sınıflandırılır.

Asemptomatik veya subklinik bruselloz, genellikle çiftçiler, mezbaha çalışanları ve veterinerlerde gözlenir. Hastada, hastalığın semptom ve bulguları yoktur. Tanı pozitif seroloji ile konur. Akut formda ise çoğunlukla ateş, halsizlik, iştahsızlık, baş ağrısı, sırt ağrısı, kilo kaybı, miyalji ve artralji vardır. Hastaların % 85'inden fazlasında ateş 38.5°C'nin üzerindedir. Splenomegali ve hepatomegali % 6-35 oranında vardır. Herhangi bir organ tutulumu olabilir ancak en sık artrit izlenir. Subakut form eksik veya yetersiz antibiyotik tedavisi alan veya yanlış tanı nedeniyle uygunsuz antibiyotik tedavisi alan hastalarda izlenir. Subakut formda farklı klinik tablolar izlenir ve ülkemizde bilinmeyen ateşin en önemli nedenlerindedir. Semptomlar genellikle ılımlıdır ve lokalize enfeksiyonlar izlenebilir. Kronik bruselloz kronik yorgunluk sendromuna benzer. Çocuklarda nadir izlenirken yaşlılarda sık görülür. Daha çok psikonevroz, terleme ve kilo kaybı gözlenir. Ateş nadirdir ve lokalize enfeksiyonlar izlenebilir. Kronik brusellozda IgG antikorunun yüksek titrelerde olması önemli laboratuvar bulgusudur. Kronik brusellozda semptomlar uzun süre sonra tekrarlayabilir (Aktug Demir, 2009; Hayat, 2000).

2.8. Komplikasyonlar

Enfeksiyon ajanı olan organizmaların kandan izole edilmediği fakat kemik, eklemler, BOS, karaciğer, böbrekler, dalak veya cilt gibi spesifik dokularda lokalize

olduğu durumlar komplikasyon olarak adlandırılır (Doğanay ve Aygen, 2003). Lokalizasyon sistemik enfeksiyonun esas belirtisi veya kronik bir enfeksiyonun tek klinik tablosu olabilir. Herhangi bir organ tutulumunun tanımlanması antibiyotik rejiminin seçimi, süresi ve prognoz için çok önemlidir.

2.8.1. İskelet Sistemi

Osteoartiküler komplikasyonlar brusellozda yaygındır. Bu komplikasyonlar artrit, spondilit, sakroileit, osteomyelit, tenosinovit ve bursit şeklinde olabilir. Eklem ağrısı brusellozlu hastaların % 85'inde görülebilir (Trujillo ve ark., 1994). Birçok çalışmada osteoartiküler tutulum % 17-37 hastada görüldüğü rapor edilmiştir. *B. melitensis* hemen hemen bütün vakalardaki osteoartiküler tutulumdan sorumludur (Aygen ve ark., 2002; Trujillo ve ark., 1994). En sık etkilenen bölgeler sakroiliak eklemlerdir. Spondilit brusellozun en ciddi komplikasyonlarından biridir. Brusellozlu hastalarda % 2-58 oranında rapor edilmiştir. Bu komplikasyon genellikle yaşlı hastalarda görülür ve lomber vertebraları etkiler. Sırt veya boyun ağrısı, ateş ve konstitüsyonel semptomlar en yaygın semptomlardır. Enfeksiyonun genişlemesi ile paravertebral apseler, spinal epidural apseler ve nörolojik komplikasyonlar görülebilir. (Aygen ve ark., 2002).

2.8.2. Sinir Sistemi

Sinir sistemi tutulumu bruselloz vakalarının yaklaşık % 2-6,5'inde görülür. Nörolojik komplikasyonlar hastalığın herhangi bir döneminde gelişebilir. Klinik sendromlar menenjit, ensefalit, meningoensefalit, radikülit, miyelit ve nörit şeklinde olabilir (Aygen ve ark., 2002; McLean ve ark., 1992). Menenjit en sık santral sinir sistemi komplikasyonudur. BOS incelemesinde lenfositik pleositoz, artmış protein, düşük glukoz seviyeleri görülür (McLean ve ark., 1992).

2.8.3. Kardiyovasküler Sistem

Endokardit en ciddi klinik formdur ve ölüme neden olabilir. Bununla birlikte vakaların % 2'den azında gelişir. Klinik prezentasyon *Brucella*'nın kan kültürlerinden izolasyonundaki zorluklar haricinde diğer bakteriyel endokarditlere benzerdir. Genellikle aort kapağı veya mitral kapak tutulur (Hadjinikolaou ark., 2001). Miyokardit, perikardit ve enfekte aort anevrizması bildirilmiştir. Endokarditle birlikte menenjit, pnömoni, hepatit, cilt lezyonları, nefrit ve peritoniti içeren multisistem tutulumlar rapor edilmiştir (Aygen ve ark., 2001).

2.8.4. Gastrointestinal Sistem

Anoreksi, bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı ve gastrointestinal kanama brusellozda görülebilir (Aygen ve ark., 2002; Young, 2000). Karaciğer enzim düzeylerinin hafif yüksekliği ile birlikte karaciğer ve dalak büyümesi brusellozlu hastaların yaklaşık % 50'sinde saptanabilir. Bununla birlikte diffüz hepatit veya granümatöz hepatit de brusellozun seyri sırasında görülebilir (Ariza ve ark., 2001; Young, 2000). Karaciğer ve dalakta apseler ve sirotik hastalarda spontan peritonit de brusellozun nadir komplikasyonları olarak rapor edilmiştir (Ariza ve ark., 2001; Demirkan ve ark., 1993).

2.8.5. Hematopoetik Sistem

Anemi, lökopeni ve trombositopeni gibi hematolojik anormallikler bruselloz seyriinde sıktır. Lenfositozla birlikte lökopeni brusellozun karakteristiğidir (Aygen ve ark., 2002; Young, 2000). Peteşiyal veya purpurik cilt ve mukoza lezyonları, epistaksis, hemoptizi ve gastrointestinal veya vajinal kanama görülebilir ve bu komplikasyonlar önemli oranda düşük trombosit sayısı, düşük fibrinojen düzeyi ve pıhtılaşma zamanının uzaması gibi pıhtılaşma anormallikleri ile ilişkilidir. Bazen trombositopeni kanama ve ölüme sonuçlanabilir. Trombositopeni muhtemel mekanizmaları hipersplenizm, reaktif hemofagositoz ve trombositlerin immün yıkımıdır (Young ve ark., 2000).

2.8.6. Genitoüriner Sistem

Genitoüriner tutulum brusellozlu hastaların % 1-20'sinde meydana gelir. Tek taraflı epididimoorşit klasik manifestasyondur. Piyelonefrit, interstisiyel nefrit, renal apse, sistit ve prostatit nadir komplikasyonlardır. Semptomların başlangıcı genellikle akut ve daha az sıklıkla subakut veya kroniktir. Klinik görünüm genitoüriner ve sistemik semptomları içerir (Navarro-Martinez ve ark., 2001). *Brucella* türlerinin gebelik boyunca insanda koryoamniyonik dokuyu enfekte edebileceği; düşük, erken doğum ve fetal ölümle birlikte intrauterin enfeksiyona neden olabileceği öne sürülmektedir. Ancak çeşitli çalışmalarda insanlarda, gebelikte *Brucella* enfeksiyonunun etkisi diğer bakteriyel enfeksiyonlardan fazla olmadığı bildirilmiştir (Young, 2000).

2.8.7. Diğer Sistemler

Brusellozda çeşitli cilt lezyonları (makülopapüler lezyonlar, papüller, peteşiler, purpura, impetiginöz ve psöriiform lezyonlar), oküler lezyonlar (üveit, koroidit ve sklerit) solunum sistemi tutulumu (pnömoni, akut respiratuvar distress sendromu, ampiyem, mediastinit) tanımlanmıştır (Young, 2000).

2.9. Tanıda kullanılan yöntemler

2.9.1.Kültür

Bruselloz tanısında kan kültürü altın standarttır. Klinik örneklerden *Brucella* türlerinin izolasyonu için bifazik *Ruiz-Castañeda* sistemi geleneksel metod olmasına rağmen; artmış duyarlılık ve azalmış inkübasyon süresi ile otomatize kültür sistemleri büyük ölçüde bu yöntemin yerini almıştır (Franco ve ark., 2007; Ozturk ve ark., 2002).

Kan kültürünün duyarlılığı, hastalığın evresi ve antibiyotik kullanımı gibi bazı faktörlere bağlıdır (Doganay ve Aygen, 2003; Francove ark., 2007). Örneğin; akut vakalarda *Ruiz-Castañeda* metodu ve lizis santrifügasyonunun duyarlılıkları sırasıyla % 80 ve % 90 iken, kronik vakalarda % 30 ve % 70 bulunmuştur (Franco ve ark., 2007; Gaviria-Ruiz ve Cardona-Castro, 1995). Kemik iliği kültürleri ise daha yüksek

duyarlılık ve daha kısa kültür süresi sağlayabilir *Brucella* bakterisinin ayrıca pü, doku örnekleri ve serebrospinal, plevral, eklem ve asit sıvılarından da kültürü yapılabilir (Franco ve ark., 2007).

2.9.2. Serolojik Tanı

Kültürde üreme olmadığı durumlarda bruselloz tanısı genel olarak *Rose-Bengal* testi, serum aglütinasyon testi ve antiglobülin veya *Coombs* testi gibi serolojik aglütinasyon testleri ile konur. *Rose-Bengal* testi bir tarama testidir ve pozitif sonuçlar serum aglütinasyon testi ile doğrulanır (Al Dahouk ve ark., 2003; Ruiz-Mesa ve ark., 2005). Bu aglütinasyon testleri S-LPS'ye karşı oluşan antikorlara verilen yanıtla ilişkilidir. Bu antikorlar enfeksiyon geçtikten sonra da hastalarda uzun süre kalma eğilimindedir. *Rose-Bengal* testinin duyarlılığı yüksektir ve yanlış negatif sonuçlar nadir olarak gözlenmiştir (Ruiz-Mesa ve ark., 2005; Serra ve Vinas, 2004). Kullanılan antijen kalitesindeki ve sonuçların yorumlanmasındaki farklılıklar test sonuçlarını etkileyebilir. Diğer serolojik testlerde olduğu gibi, bruselloz için doğrulayıcı aglütinasyon testlerinin duyarlılık ve özgüllüğü kullanılan “*cut-off*” değerine ve popülasyondaki antikorların düzeyine bağlıdır.

ELISA yöntemi bruselloz için kullanılan en uygun tekniklerden biridir ve sıklıkla kullanılmaktadır. Laboratuvarda hazırlanan ELISA'ların duyarlılığı özellikle spesifik antikorların (IgM, IgG) saptanmasında yüksek olabilir (Mantecon ve ark., 2006). Son yıllarda geliştirilen *Brucellacapt* yöntemi ile yapılan çalışmalarda *cut-off* değeri 1/80'de olan hastalar için % 98'lik bir duyarlılık ve sağlıklı gönüllülerden alınan örneklerde % 96'lık bir özgüllük gözlenmiştir. Daha yüksek bir *cut-off* değerinde özgüllük artar fakat duyarlılık azalır. Bruselloz için *fluorescence polarization immunoassay* (FPA) ve ELISA'nın basitleştirilmiş bir versiyonu olan immünokromatografik *Brucella* IgM/IgG *lateral flow assay* (LFA) gibi hızlı testler tanısal olarak büyük bir potansiyele sahiptir (Lucero ve ark., 2003; Irmak ve ark., 2004). FPA testi bir floresan proba bağlı *Brucella* O-polisakkarit antijeni ile bir serum örneğinin inkübasyonu yoluyla yapılır (Lucero ve ark., 2003). LFA testinin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir (% 95'den fazla) ve test hastalığın bütün dönemlerinde kullanılabilir (Hasanjani-Roushan ve ark., 2005). Günümüzde tedavi sonucunu ve

relapsı tahmin eden testler mevcut değildir. Brusellozda 2-merkaptoetanol (2-ME) testi bazen tedaviye yanıtı izlemek için kullanılır. Tedaviden 12 ay sonra ölçülen düşük 2-ME titresinin iyileşme ile kalıcı olduğu gözlemlenmiştir, ancak yükselmiş 2-ME titreleri göstermeye devam eden hastaların önemli bir bölümü semptomatiktir. Bununla birlikte 2-ME'nin prediktif değeri tartışmalıdır. İnsan brusellozunda relaps ve tedavi başarısızlığından dolayı tedavi sonucunu tahmin etmek için daha kesin belirteçlere ihtiyaç vardır. İki boyutlu jel elektroforezi ile birkaç immünojenik *Brucella* proteini tanımlanmıştır. Bu proteinlerin bazıları enfeksiyon sırasında ifade edilir. Bunun tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde tanısal önemi olabilir (Nockler ve ark., 2006).

2.9.2.1. ELISA

ELISA, *Brucella* türlerine karşı gelişen antikorların gösterilmesinde en duyarlı yöntemdir. ELISA testinde kullanılan antijenler: *B. abortus* hücreleri, LPS, *B. abortus*'un tuz özütü proteini, *B. melitensis*'e özgün hapten polisakkaritleri, *B. melitensis*'in dış membran proteini ve *B. abortus* ve *B. ovis* sitoplazmik proteindir. Sığır ve insan antiglobülinleri fare, tavşan ve keçiden elde edilerek *horseradish peroxidase* (HRP) ve alkalın fosfat gibi indikatör enzimlerle konjuge edilmiştir.

Brucella ELISA testinde bazı noktalara dikkat edilmesi gerekmektedir. Birincisi *B. abortus* LPS ELISA, IgM izotiplerinin belirlenmesinde kullanılmaz. İkincisi, pozitif "endpoint," negatif kontrol serumuna ait absorban değerine bağlı olarak değişir. Ayrıca standardize antijen yokluğu ve anti-insan globülin kalitesinde görülen farklılık testin performansını etkilemektedir.

2.9.3. Moleküler Tanı

2.9.3.1. PCR

PCR; DNA kopyalanması ve çoğaltılması olayıdır. Temel olarak mekanizma yüksek sıcaklıkta yapısı bozulmayan bir DNA polimeraz kullanılarak, bir *Thermo Cycler* (Isı Düzenleyici) yardımıyla DNA replikasyonunun in vitro ortamda tekrarlanması sonucu DNA'nın çoğaltılmasını sağlamaktır. Bu mekanizma

günümüzde moleküler biyoloji ve genetik laboratuvarlarının sıkça kullandığı bir yöntemdir. Tipik bir PCR üç temel basamakta gerçekleşir:

Denatürasyon; İlk aşamada DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılır (denatürasyon). Çoğunlukla 94°C-97°C arasında 15-60 saniye süresince uygulanır (İlk denatürasyon tek saykıl olarak 15 dakikaya kadar uygulanır).

Annealing (Bağlanma); Denatürasyonu takiben daha düşük ısılarda oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar. Bu olay genellikle 47°C ile 60°C arasında 30-60 saniyede gerçekleşir. (Guanin/Sitozin oranı yüksek olan bölgelerde bağlanma ısı 68°C'ye kadar arttırılabilir).

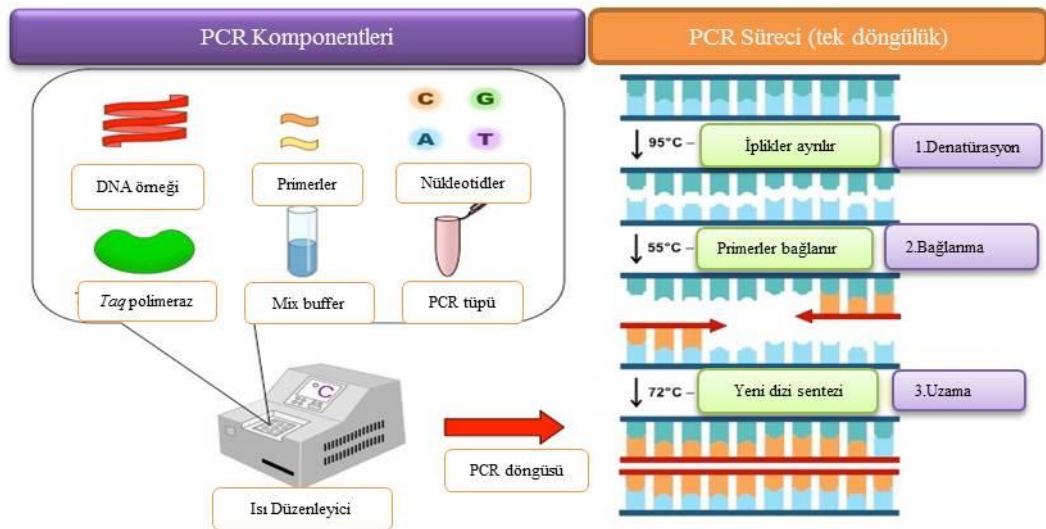
Elongasyon (uzama); Son aşamada ısı 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır. Elongasyon basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre 30 saniye ile 3 dakika arasında değişir.

Isı düzenleyicinin bu üç basamağı her tekrarında DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkar. Oluşan ürün; ilk koyulan DNA miktarı ve döngü sayısına bağlıdır. 25-40 döngü uygulanır (Şekil 5).

Klasik PCR normalde sayısal (kantitatif) bir değerlendirme ölçüsü değildir fakat kantitatifte dönüştürülür. Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR)'da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve probların verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir. Çift zincirli DNA'ya bağlanan *SYBR-Green I* floresan boya en basit metottür. Ayrıca, güvenilir bir şekilde kullanılan üç adet floresan ışımaya yapabilen işaretli prob da vardır. Bunlar *TaqMan*® *probe* veya hidroliz prob, moleküler boncuk yöntemi ve hibridizasyon problemlerini içeren problemlerdir.

PCR kültürle kıyaslandığında duyarlılığı artırabilen, insan brusellozunun tanısı için elverişli bir yöntemdir. Birkaç cins spesifik PCR sistemi primer eşleşmeleri kullanır; 16S RNA sekanslarını ve geliştirilen farklı dış membran proteinlerinin genlerini hedef

alır. Bu PCR sistemlerinin her biri farklı bir DNA ürünü ortaya koyar ve bunun uzunluğu bütün *Brucella* türleri için aynıdır, hepsine spesifiktir. Queipo-Ortuno ve arkadaşları bcp31 geninin 223-bp fragmanını açan B4/B5 primer çiftini kullanarak, kan kültürü için % 70 duyarlılıkla kıyaslandığında duyarlılığı % 100 ve özgüllüğü % 98.3 bulmuşlardır (Queipo-Ortuno ve ark., 1997). PCR ayrıca tür farkı ve izolatların tiplendirmesinde kullanışlı gibi görünmektedir. *Brucella* genomunda farklı lokuslarda kısa nükleotid tekrar sekanslarının varlığı tür ve izolatlar arasında tekrarların sayılarında geniş bir varyasyon göstermektedir (Bricker ve ark., 2003; Whatmore ve ark., 2006). Bu değişken tekrarların PCR amplifikasyonu tür ve biyovar tanımlaması için klasik tiplendirme metodlarından daha kullanışlı ve dış membran protein tiplendirmesi IS711 tiplendirmesi veya yükseltilmiş fragman polimorfizm yoluyla tiplendirme gibi diğer moleküler araçlardan daha etkilidir (Vizcaino ve ark., 2004; Whatmore ve ark., 2005). Bu tekrarları içeren bir dizi lokusun PCR amplifikasyonu aynı bölgenin içinden bile yalnız izolatların tanımlanmasına izin verir (Al Dahouk ve ark., 2007; Le Fleche ve ark., 2006). Bu uygulama özel gruplarda veya süt ürünü üreticilerinde enfeksiyonları izlemeye epidemiyolojik olarak kullanılabilir ve aynı izolatlarla vakaların ortaya çıkması muhtemelen yoğunlaşmış bulaşın bir odağının varlığı için kanıt olarak tutulabilir. Ayrıca bu metod reenfeksiyon ile relaps ayırımında faydalı olabilir (Al Dahouk ve ark., 2007).



Şekil.5. PCR basamakları (Reece ve ark., 2011).

2.10. Tedavi

Brusellozda antimikrobiyal tedavi ile semptomlar düzelir, hastalığın süresi kısalmır, komplikasyon ve relaps insidansı azalır. Pek çok antibiyotiğin *Brucella*'ya karşı in vitro etkinliği vardır, ancak *Brucella* türleri hücre içi mikroorganizmalar oldukları için in vitro etkinlik her zaman in vivo etkinliği göstermemektedir. Brusellozda kullanılacak antibiyotiğin in vitro etkinliği yanında yeterli hücre içi konsantrasyona da ulaşması gereklidir. Ayrıca kombine tedavi kullanılmalı ve tedavi süresi uzun olmalıdır (Doğanay ve Aygen, 2003; Young, 2005).

Yapılan çalışmalarda tetrasiklin, doksisisiklin, rifampisin, streptomisin ve trimethoprim-sulfametoksazolün *B. melitensis*'e in vitro etkili olduğu gösterilmiştir (Doğanay ve Aygen, 2003; Young, 2005). Tetrasiklinler bruselloz tedavisinde etkili ilaçlardır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün kombinasyon tedavisinde önerdiği doksisisiklin (günde 2 kez 100 mg, 6 hafta) ve streptomisin (1 g/gün, 2 hafta) tedavi rejimi yaygın olarak kullanılmaktadır. Kinolonların özellikle ofloksasin ve siprofloksasin in vitro etkinliğinin iyi olduğu gösterilmiştir (Doğanay ve Aygen, 2003). Kinolon tedavisinde relaps oranları yüksek olmasına rağmen kombinasyon tedavisinde başarılı sonuçlar alınmıştır (Alp ve ark., 2006; Doğanay ve Aygen, 2003).

Brusellozda tedavi başarısızlığı, akut olgularda üçüncü haftanın sonunda hastanın semptomlarının ve kültür pozitifliğinin devam etmesi, subakut ve kronik olgularda ise tedavi sonunda enfeksiyona ait semptomların artması, IgG (immünglobülin G) sınıfı antikor, eritrosit sedimentasyon hızı ve C-reaktif protein (CRP) düzeyinde artış olması olarak tanımlanır. Tedaviden sonraki 12 ay içinde enfeksiyona ait belirtilerin tekrarlanması, IgG sınıfı antikor düzeyinde artış olması, yeni patolojik radyografik bulguların olması, kan veya doku kültürü pozitifliğinin olması relaps olarak kabul edilir. Bakteriolojik relaps tedavinin kesilmesinden kısa süre sonra (3-6 ay) gerçekleşebilir. Tedavi başarısızlığı ve relaps genelde antibiyotik direncine bağlı değildir. Daha çok yetersiz ya da etkinliği az tedavi uygulanması, hastalığın başlangıcında pozitif kan kültürü, hastanın cinsiyeti gibi durumlar relaps için etkindir (Alp ve ark., 2006; Doğanay ve Aygen, 2003).

2.11. Bruselloz Patogenezi

Brucella türleri insanlar ve hayvanlar için enfeksiyöz bakterilerdir ve buldukları konağa iyi derecede adapte olurlar. Bunlar makrofajlar içinde hayatta kalan ve çoğalan, dış ortamda uzun süre yaşamını sürdüremeyen, fakültatif hücre içi patojenlerdir. Bakteriler vücuda sindirim, solunum, deriyle temas veya konjonktival mukozaya yolu ile girebilir (Corbel MJ, 1997; Memish Z, 2001; Trujillo IZ, 1994). Gastrik sıvının pH'ının düşük olması oral enfeksiyona karşı koruma sağlar. Antiasit veya H₂ reseptör blokerleri bruselloza duyarlılığı arttırabilir. Normal bir insan serumunda *Brucella* bakterisine immün yanıt orta düzeydedir ve organizmalar kompleman tarafından fagositoz için opsonize edilir. İnsan nötrofilleri bazı *Brucella* suşlarını yok edebilir ancak *B. melitensis* üzerinde etkin değildirler (Young, 1997; Young, 2000).

Virülan *Brucella* türleri fagositik ve fagositik olmayan hücrelerin ikisini de enfekte edebilir. Diğer patojenik bakterilerden farklı olarak *Brucella* türlerinde hiç klasik virülans faktörü tanımlanmamıştır. Bunların yerine *Brucella* türlerinde virülans elementleri olarak, bakterinin invazyonuna izin veren, hücre içi öldürmeye dirençli ve fagositler içinde bunların üremesini sağlayarak hücreye ulaştıran bazı moleküler determinantlar tanımlanmıştır (Lopez-Goni ve ark., 2002).

Hastalık sırasında *Brucella* bakterileri ilk önce mukozaya geçiş yapar, submukozaya altındaki olgun fagositler bakteriyi içine alır. Makrofajlar ve nötrofiller fermuar benzeri fagositoz yolu ile patojeni hücre içine çeker. Opsonize türler kompleman ve Fc (fragment crystallizable) reseptörleri yardımıyla makrofaj ve monositler içine alınırken opsonize olmayan türler lipidle taşınır (Lopez-Goni ve ark., 2002, Naroeni ve Porte, 2002; Pizarro-Cerda ve ark., 2000; Watarai ve ark., 2002). Rho (Ras homolog gene family), Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate), Cdc42 (Cell division control protein 42) gibi Rho alt ailesinin küçük GTPaz (guanosine triphosphatase)'lerinin aktivasyonu *Brucella* bakterisinin olgunlaşmamış fagositlere girişi için gereklidir (Lopez-Goni ve ark., 2002; Pizarro-Cerda ve ark., 2000). Son yıllarda konak hücre invazyonunda rol oynayan düzenleyici iki komponentli bir sistem (*Brucella* virülans ilişkili regülatör veya sensör proteinleri; BvrR/BvrS) tanımlanmıştır (Gorvel ve Moreno, 2002; Lopez-Goni ve ark., 2002).

Brucella bakterisi hücre içine girdiğinde, kendi çoğalma alanına ulaşana kadar özgün bir yolak aracılığıyla hücre içi trafiğini yönlendirir. Fagositler genellikle hücre içine alınmış bakteriyi öldürme eğilimindedir. Bakterilerden çok azı lizozom füzyonundan kaçma ve çoğalmalarının son safhasına kadar hücrenin trafiğini kontrol etme yeteneğindedir (Gorvel ve Moreno, 2002; Pizarro-Cerda ve ark., 2000).

Brucella enfeksiyonu boyunca IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-10 ve IL-12 gibi sitokinler, makrofajlar içindeki *Brucella* suşlarının büyümesini kontrol eder (Gorvel ve Moreno, 2002).

İnsanlarda *Brucella* enfeksiyonu epiteloid hücreler, polimorfonükleer lökositler, lenfositler ve bazı dev hücreleri içeren granülom oluşumu ile sonuçlanır. Granülomatöz cevap *B. abortus* enfeksiyonları için karakteristiktir. *B. melitensis* enfeksiyonlarında granülomlar çok küçüktür fakat sıklıkla toksemi görülür. *B. suis* enfeksiyonunda ise eklemlerde ve dalakta kronik apse eşlik eder (Trujillo ve ark., 1994; Young, 2000).

Brucella enfeksiyonu, hümmoral ve hücreyel immünitenin ikisini de endükleme yeteneğindedir. Temel iyileşme mekanizmasını hücre aracılı immünite oluştururken, hümmoral antikorlar da *Brucella* bakterisine dirençte rol oynamaktadır. İnsanlarda *Brucella* enfeksiyonuna karşı antikor cevabı ilk safhada IgM sınıfı antikorların artışıyla gözlenir ve birkaç hafta içinde IgG antikorlarının baskın hale gelmesiyle karakterizedir. Tedavi sonrası titreler IgG antikorlarında IgM antikorlarından daha hızlı düşüş göstererek azalır. Relaps durumunda IgG tipi antikorlar yeniden yükselişe geçebilir (Trujillo ve ark., 1994; Young, 2000).

İnsanlarda gelişen enfeksiyon, hayvanlarda oluşan enfeksiyondan farklıdır. İnsanlarda enfekte makrofajlar vücutta özel bölgelerde (dalak, beyin, kalp, kemikler) yerleşerek endokardit, artrit, menenjit ve osteomyelite neden olur. Evcil hayvanlarda (koyun, keçi, sığır, domuz) ise dişilerde düşüklere, erkeklerde orşite neden olur. Fareler ise doğal yoldan enfeksiyon gelişmez. Laboratuvarında enfekte edilen farede gelişen geçici bakteriyemi haftalar içerisinde yavaşça geçer. Bu gözlemler *Brucella* türleri ile değişik konakların immün sistemleri arasında türe spesifik etkileşim olduğunu düşündürmektedir.

Temel olarak, konak immün yanıt fonksiyonel açıdan doğal (non-spesifik) ve edinsel (spesifik) immün yanıt olmak üzere ikiye ayrılır. Doğal immün sistem, istilacı

patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturur. Doğal immün sistemin elemanları, anatomik bariyerler (deri ve internal epitelyal tabakalar), sekreteruar molekülleri (çeşitli kemokin ve sitokinler, kompleman sistem ve opsoninler), fagositleri (nötrofiller, monositler/makrofajlar, dendritik hücreler) ve doğal lenfosit alt gruplarını (NK hücreler ve $\gamma\delta$ T hücreler) içerir. Edinsel immün sistem ise sitokin üretimi ve sitotoksisiteyi içeren T lenfositler (hücrel immünite) ve antikor üretiminden sorumlu B lenfositleri (hümorale immünite) kapsar.

2.12. Brusellozda İmmün yanıt

Konak immün yanıtı doğal ve edinsel immün yanıt olmak üzere iki gruba ayrılır. Doğal immün yanıt istilacı patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturur. Fiziksel bariyerler (epitelyal hücreler), hümorale komponentler (kemokinler, kompleman sistem, opsoninler), hücrel komponentler (fagositler) ve doğal lenfosit alt gruplarını (NK hücreler, $\gamma\delta$ T hücreler) içerir. Edinsel immün yanıt ise hücre aracılı ve hümorale yanıt olarak iki gruptan oluşur. T lenfositler sitokin üretimi ve sitotoksik etkilerle hücre aracılı immünitede önemli rol oynar. B lenfositler ise antikor üreterek hümorale immün yanıtları düzenler.

2.12.1. Brusellozda Doğal İmmün Yanıt

2.12.1.1.Epitelyal bariyerler

Epitelyal hücreler, konağın sindirim, genitoüriner ve solunum sistemlerinin mukozal yüzeylerinde bulunan ve ilk savunma hattını oluşturan fiziksel bariyerlerdir. İntestinal epitelyal hücreler sadece enterik patojenlerin istilasını bloke etmez, aynı zamanda immün yanıtları da endükler. Epitelyal hücreler doğal immün sistem reseptörlerini eksprese eder, mikrobiyal patojenleri tanır ve pro-enflamatuvar mediatörleri üretir. *Brucella* bakterisi, intestinal epitelyal hücrelerde sadece zayıf bir pro-enflamatuvar yanıtı endüklerken kemokin ligand 20 (CCL20) aracılığ ile daha etkili bir immün yanıt üretir. İntestinal boşluğun gastrik sıvıları, enterik *Brucella* bakterisini düşük pH'lı ve sindirim enzimleri içeren bir çevreye maruz bırakır.

Microfold (M) hücreleri Peyer plaklarının folikül ilişkili epitelyumunda ve bronş ilişkili lenfoid dokularında bulunur. Bu hücreler, fagositlerce doğal immüniteyi uyarmak için, istilacı *Brucella* türlerini lümeninden epitel hücrelerin altındaki immün hücrelere taşır.

Brucella bakterisi, hücre içerisinde replike olmak ve daha uzun süreli kalmak için doğal ve edinsel immün sistemi istila etmek üzere çeşitli stratejiler geliştirmiştir. Bruselloza karşı ilk savunma hattını fagositler (nötrofiller, makrofajlar, DH'ler ve NK hücreler), sitokinler ve kemokinler gibi farklı sekretuar moleküller, patern tanıyıcı reseptörler (PRR) tarafından patojen ilişkili moleküler paternlerin (PAMP) tanınması ve kompleman sistemin aktivasyonu oluşturur (Diacovich ve Gorvel, 2010).

2.12.1.2. Toll Benzeri Reseptörler (TLRs)

TLR'ler konak hücrelerde en iyi tanımlanmış PRR'lerdir. TLR aracılı reseptör-ligand etkileşimi, nükleer faktör kappa-B (Nf- κ B), mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) ve diğer çeşitli sinyal yolları sayesinde anti-mikrobiyal peptidler ve pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimini endükler (Kawai ve Akira, 2006).

TLR'ler ile tanıma ve sinyalizasyon, ASH (antijen sunan hücre)'lerin aktivasyonu ve edinsel immün yanıtın uyarımı için önemlidir. TLR'ler, temel transkripsiyon faktörleri NF- κ B, aktivatör protein-1 (AP-1) ve IFN regülatör faktör (IRF) 3/7 aktivasyonunu sağlayan, LPS, lipoprotein ve nükleik asitler gibi çeşitli bakteriyel PAMP'ları tanır. Böylece, TLR sinyalizasyonu çeşitli pro-enflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-12, IL-6, IL-1 β , tip I IFN'lar) üretimini ve doğal ve edinsel immünite arasında köprü görevi gören eş-uyaran (CD80, CD86) moleküllerinin ekspresyonunu sağlar. Yapılan çalışmalarda, enfekte makrofajlar ve DH'lerde *B. abortus* ve *B. melitensis*'in klirensi için gerekli olduğu saptanan TLR-9'un konak savunmasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Özellikle IL-12 üretimini endükleyerek Th1 tip yanıt oluşumuna yardımcı olur.

Yapılan çalışmalarda, TLR-2 ve TLR-4'ün *Brucella*'nın tanınmasında rol oynadığı gösterilmiştir. TLR-2, Omp16 (outer membrane protein 16) ve Omp19 gibi *B. abortus* lipoproteinleri tarafından stimüle edilen peritoneal makrofajlarda TNF- α , IL-6, IL-12 ve IL-10 salınımını uyarır ve pro-enflamatuvar yanıtın sorumludur (Giambartolomei

ve ark.,2004; Oliveira ve ark., 2008). TLR-4'ün TLR-9 ile uyumlu çalıştığı *B. melitensis* direncinde gösterilmiştir. TLR-4 ile *Brucella* LPS'sinin etkileşimi NF- κ B'yi uyarır ve *Brucella* türüne ait lumazin sentaz enzimiyle etkileşimi artan eş uyaran molekülleri ve MHC sınıf II ekspresyonunu takiben DH olgunlaşmasını stimüle eder (Berguer ve ark., 2006; Oliveira ve ark., 2008).

Brucella enfeksiyonu süresince, makrofaj/DH'lerde IL-12, TNF- α üretimi ve DH olgunlaşması bozulur. MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) proteini yokluğunda enflamatuvar kemokinlerin; RANTES (CCL5), MCP-1 (CCL2; Monocyte chemoattractant protein 1), MIP-1 α (CCL; macrophage inflammatory protein 1-alpha) seviyeleri azalır (Macedo ve ark., 2008). MyD88 molekülü, T hücre aracılı IFN- γ üretimi ve bruselloz kontrolü için gereklidir. Ayrıca, enfeksiyon süresince Th1 yanıtı uyarımı MyD88 bağımlı yolak ile düzenlenmektedir. Bu molekül, IL-1 ve IL-18'i içine alan diğer enflamatuvar sinyal yollarında da kullanılmaktadır (Macedo ve ark., 2008).

TLR-6, bakteriyel peptidoglikan ve lipoproteinleri tanır ve TLR-2 ile uyumlu çalışarak NF- κ B sinyal yolağını endükler. TLR-9'un, farelerde *B. abortus* enfeksiyonu kontrolünde önemli rol oynadığı gözlenmiştir (de Almeida ve ark., 2013; Ozinsky ve ark., 2000).

2.12.1.3. Fagositer Hücreler

Fagositoz, vücuda giren mikroorganizmaların ya da vücutta ölmüş olan hücrelerin fagositik hücrelerce tanınıp yutularak ortadan kaldırılması işlemidir. Bu işlemde görev alan en önemli hücre grupları; doğal immün sistem elemanlarından nötrofiller ve makrofajlardır.

Nötrofiller bakteriyel enfeksiyonların akut fazında koruyucu rol oynar. Patojenin bulunduğu alana ilk gelen hücreler nötrofillerdir. Ayrıca mikrobiyal patojenlere karşı doğal immün yanıtta görev alan en önemli kısa ömürlü fagositik hücrelerden biridir. Brusellozda bu hücreler, efektif degranülasyon için uyarılmamıştır. *Brucella* patojeni nötrofiller içerisinde replike olamasa da enfeksiyonun başlangıç evresinde hayatta kalabilir (Barquero-Calvo et al., 2007). *Brucella* lenfoid dokulara geçerken, taşınmaya yardımcı olan hipoksilat, fosfolipaz A2, katelisin, lizozim, reaktif oksijen ara

ürünleri (ROI) ve reaktif nitrojen ara ürünleri gibi defensinlere karşı farklı antimikrobiyal direnç mekanizmalarına sahiptir. Konak immün sistemi, *Brucella*'yı TLR-2, TLR-4 ve TLR-5 reseptörleri ile tanır (Iwasaki and Medzhitov, 2004).

Makrofajlar, doğal immün sistemin anahtar elemanlarıdır ve dokularda *Brucella*'nın hücre içi replikasyonu için önemli bir bölge oluşturdukları gösterilmiştir. Makrofajlar tarafından hücreye alınan *Brucella* bakterilerinin % 90'ından fazlası fagositozdan hemen sonra öldürülürken bir kısmı hayatta kalmayı başarır ve fagositik hücrelerin yaşamını etkilemeden çoğalma için uygun ortam hazırlar. Aktive makrofajlar hücre içi *Brucella*'yı öldürmede daha etkilidir (Jiang ve Baldwin, 1993). Ayrıca yapılan çalışmalarda, yabanıl tip (wild-type) virülan suşların, enfeksiyondan sonraki bir zaman aralığında da çoğalabildiği gözlenmiştir (Baldwin ve Goenka, 2006).

Farklı *Brucella* türlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, *B. abortus*, *B. suis* ve *B. melitensis*'in insan ve fare makrofajlarında etkili sağkalımları ve replikasyonları gösterilmiştir. *B. ceti* ve *B. pinnipedialis* gibi deniz türlerine ait bazı suşların, insan makrofajlarında *B. melitensis* ile aynı seviyeye kadar replike olabildiği gözlenmiştir. Diğer suşlar ise 48 saat içinde temizlenmiş veya hiç fagositoz olmamıştır (Maquart ve ark., 2009).

Bunların yanında, *B. mikroti*, insan ve fare makrofajlarında virülan *B. suis*'den daha etkili bir şekilde çoğalmış ve farelerde gelişkin letalite göstermiştir (Jimenez de Bagues ve ark., 2010). Bu sonuçlar, yeni izole edilen *Brucella* türlerinin insanlar için yüksek patojenik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Makrofajların enfekte olması sadece hücre içi bakteriyel çoğalma ile ilişkili değildir, aynı zamanda makrofaj fonksiyonları ile etkileşime de bağlıdır. İnsan monositlerinde / makrofajlarında *B. abortus*, Fc γ RI reseptörünün ve Fc γ RI aracılı fagositozun IFN- γ ile endüklenmiş ekspresyonunu inhibe eder; fare makrofajlarında ise *B. abortus*'un LPS'si antijen sunumu ve T hücre aktivasyonunu inhibe eder (Forestier ve ark., 2000). *Brucella* bakterisine ait çeşitli faktörler insanda spesifik etkiler gösterebilir; makrofaj benzeri hücrelerin TNF- α ekspresyonunun inhibe edebilmesi de bunlardan biridir.

2.12.1.4. Doğal Lenfoid Hücreler (ILCs)

Doğal lenfoid hücreler (ILCs), doğal immün yanıtlarda ve doku yapılanmasında önemli rol oynayan, efektör ve düzenleyici fonksiyonlara sahip lenfoid hücrelerdir. Bu hücreler antijen reseptörü eksprese etmezler. B ve T hücrelerinin köken aldığı benzer ortak lenfoid prekürsörlerden kaynaklanırlar. Doğal lenfoid hücrelerin gelişimi süresince bu hücrelerin üç farklı yardımcı alt gruba ayrıldığı ve CD4⁺ T hücre alt gruplarına benzer şekilde farklı sitokin grupları salgılayarak fonksiyon gösterdikleri bilinmektedir.

Doğal lenfoid hücrelerin, ILC1, ILC2 ve ILC3 olmak üzere farklı sitokin grupları üreten ve farklı transkripsiyon faktörleri eksprese eden üç alt grubu bulunmaktadır. Bunlar, CD4⁺ T lenfositlerin alt grubu olan Th1, Th2 ve Th17 hücreleri ile analogtur. ILC1'ler, Th1 hücrelere benzer şekilde, IFN- γ üretir ve transkripsiyon faktörü T bet eksprese ederler. ILC2'ler, Th2 hücrelere benzer şekilde, IL-5, IL-9 ve IL-13 üretirler, transkripsiyon faktörü olarak GATA-3 eksprese ederler. ILC3'ler ise Th17 hücrelere benzer şekilde IL-17 ve IL-22 üretirler, transkripsiyon faktörü ROR γ t eksprese ederler. ILC'ler T hücre reseptörü eksprese etmediği için farklı mekanizmalar tarafından aktive edilmelidir. ILC sitokin üretimi için tanımlı en iyi uyaranlar, enfeksiyonlara ve doku hasarına karşı oluşan doğal yanıtlarda ortaya çıkan diğer sitokin gruplarıdır. ILC alt grupları patojenlere karşı konak savunmasına katılabilir ve enflamatuvar hastalıklara dahil olabilirler. ILC1'ler daha çok hücre içi mikroplara karşı savunmada önemli rol oynar. Bu grubun en eski ve en iyi bilinen hücreleri NK hücrelerdir. ILC2 grubu, helmantik parazitlere karşı immün yanıtta görev alır ve alerjik hastalıkların patogenezinde yer alır. ILC3'ler ise mukozal bölgelerde bulunur; hücre dışı mantar ve bakterilere karşı savunmaya katılırlar. Lenfoid doku uyarıcı (LTi) hücreler, ILC3'lerin bir alt grubudur. IL-17 ve IL-22 salınımının yanında membran molekülü lenfotoksin- α ve TNF salgırlar. Bu moleküller lenfoid organ gelişimi için önemlidir.

Toxoplasma gondii ile enfekte farelerde yapılan bir çalışmada, ILC1'lerin fazla miktarda IFN- γ ve TNF- α ürettiği, ILC3 ve konvansiyonel NK hücrelerinin ILC1'lere oranla bu sitokinleri daha az üretebildiği gözlenmiştir. Bu enfeksiyon modelinde, ILC1'ler enfeksiyon kontrolünde (enflamatuvar monositlerin enfeksiyon bölgesine

hızla göç etmesi aracılığıyla) görev alan bir hücre grubu olarak tanımlanmıştır (Klose ve ark., 2014).

Bir diğer çalışmada, *Salmonella enterica* aracılı intestinal enfeksiyonlara karşı *lamina propria*da bulunan bir grup ILC'nin akut enfeksiyon süresince IFN- γ ürettiği gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda ise intestinal ILC1'lerin mikrobiyal patojenlere karşı immün savunmayı desteklediği öne sürülmüştür (Klose ve ark., 2013).

NK hücreleri, mikrobiyal patojenlere karşı doğal immün yanıtta önemli rol oynayan ve enfekte hücreleri ön duyarlılaşmaya gerek kalmaksızın öldürebilen büyük granüllü lenfositlerdir. Bu hücre grubu ILC1'lerin içerisinde sınıflandırılmaktadır (unconventional NK cell; ILC1). NK hücreleri, spesifik immün yanıtı düzenleyen sitokinler eksprese ederek ve patojenin girdiği hücreleri yok ederek virüs, bakteri ve parazitlere karşı korunmaya aracılık eder. Temel fonksiyonları enfekte hücreyi öldürmektir ve etkinlik mekanizmaları edinsel immün yanıtta sitotoksik T lenfositlerle benzerlik gösterir. Ayrıca, NK hücreler IFN- γ üreterek fagositozda görev alan makrofajların uyarılmasını sağlarlar.

Yapılan çalışmalarda, aktive olmuş NK hücrelerin enfekte hedefleri öldürerek *Brucella*'ya karşı ilk savunma hattının oluşmasında görev aldığı gösterilmiştir. *Brucella*, IL-2 salınımı için ASH'leri uyararak NK hücrelerini aktive eder. NK hücreleri, IL-2 aktivasyonu ve Th1 tipi yanıt gelişiminde önemli rol oynayan IFN- γ üretimi ile öldürücü hücrelere dönüştürülür. Deneysel çalışmalar NK hücrelerin *Brucella* benzeri bakteriyel enfeksiyonları, patojeni tanıyarak direkt yoldan ya da sitokin salınımını uyararak indirekt yoldan engellediğini göstermektedir. Ayrıca, ısı ile öldürülmüş *B. abortus* ile bağışıklanan farelerden elde edilen veriler, B hücreleri tarafından poliklonal antikor üretiminin uyarılmasında NK hücrelerinin de rolü olduğunu göstermektedir.

İnsanlarda, akut brusellozu olan hastaların PKMH'leri geçici olarak NK sitotoksitesini göstermekte ancak etkili tedaviden sonra normal fonksiyona dönmektedir, bu da NK yanıtlarının etkinliğinin brusellozun gelişimi için önemli olabileceğini düşündürmektedir.

2.12.1.5. Antijen Sunan Hücreler (ASH)

Mikropların vücuda giriş yerleri olan epitelyal bölgeler, antijeni yakalayıp periferik lenfoid dokulara taşıyan özgül hücrelerle döşelidir. Antijenlerin tanınıp yakalanması en iyi DH gruplarında tanımlanmıştır.

DH'ler de makrofajlar gibi doğal immün yanıtta görev alan anahtar elemanlardandır. Bu hücreler, *Brucella* benzeri hücre içi bakterilere karşı edinsel immün yanıtın da uyarılmasını sağlarlar. DH'ler bakterileri elimine etmek için çeşitli endükleyci mekanizmalara sahiptir. Bakteriler ise hücrel immün yanıtlardan kaçınmak ve uzun süreli enfeksiyon oluşturmak için bu fagositik hücreleri istila edebilir. *Brucella* türleri kronik enfeksiyon oluşumu için, konağın ASH'leri ve antimikrobiyal ürünleri ile etkileşen virülans faktörleri veya PAMP'ları eksprese eder. Bu strateji, ASH'lerin düşük stimülatör aktivitesi ve toksisitesi ile karakterizedir. Bu sayede bakterilerin, Th1 tip immün yanıtların aktivasyonundan önce hücre içi replikatif forma ulaşması sağlanır. *Brucella*'nın doğal immün tanınması ile ilişkili PAMP'lar arasında LPS (Br-LPS) en iyi tanımlanmış olanıdır. Br-LPS, *Brucella*'nın konakta yaşamını sürdürmesi ve replike olması için gerekli immünomodülatör faktördür. Enfeksiyonun erken safhalarında düşük immünostimülatör aktivite gösterir, mikrobu maskeleyerek doğal immün tanınmadan gizler. Ayrıca kronik hastalık gelişimi ile doğal immün yanıtı negatif yönde stimüle eder.

Antijen sunan hücreler (makrofaj, DH), aşağıda özetlenen farklı mekanizmalarla *Brucella* bakterisini yok etmeye çalışırken, bakteriler de bu mekanizmalara aşağıda sıralanan yöntemlerle engel olmaya çalışmaktadır.

Brucella'ya karşı konak immün yanıtında antijen sunan hücrelerin rolü:

- Fagositoz ve otofaji
- Antimikrobiyal katyonik peptidler (defensinler)
- Oksidatif patlama (*reactive oxygen species*, ROS)
- Sitokin üretimi (TNF- α , IL-12)
- Kemokin salınımı (makrofajlar) MCP-1, RANTES, MIP1 α /MIP1 β
- Antijen sunumu

Konak immün yanıtına karşı bakterilerin savunması

- Fagozom füzyonunun inhibisyonu

- Fagositoz ve bakterisidal fonksiyonun inhibisyonu
- BCV biyogenezi
- Tip IV sekresyon sistemi
- Kompleman atağından korunma
- TNF- α üretiminin makrofaj ve DH'lerde azaltılması
- Makrofajlarda defektif IFN- γ sinyal iletimi

Yapılan çalışmalarda *Brucella*'nın insan ve fare DH'lerinde etkili bir şekilde çoğaldığı gözlenmiştir (Billard ve ark., 2005; Salcedo ve ark., 2008). In vitro'da, *Brucella*'nın DH'lerdeki replikasyonunun, immün sistemi uyarıcı sinyalleri azalttığı ve kronik enfeksiyon gelişimini desteklediği gösterilmiştir (Billard ve ark., 2007; Salcedo ve ark., 2008). Zwerdling ve ark., *Brucella*'nın DH'lerin aktivasyonunu önemli derecede endüklediğini göstermiştir (Zwerdling ve ark., 2008).

2.12.1.6. Sınırlı Antijen Reseptör Çeşitliliği Olan Hücreler

T ve B hücrelerinin çoğu, edinsel immün sisteminin bileşenleridir ve farklı antijen gruplarını tanıyabilen spesifik bir repertuar ile karakterize edilir. Bunun yanında, bazı küçük lenfosit popülasyonları, yapısal olarak T ve B hücrelerine benzer antijen reseptörlerini eksprese eder ancak bu reseptörlerin çeşitliliği oldukça azdır. Bu T ve B hücre alt grupları bir çok farklı mikrobiyal tür tarafından salınan yapıları tanıyabilir. Sınırlı sayıda antijen reseptör çeşitliliği olan hücreler; $\gamma\delta$ T hücreler, değişmez NKT (iNKT) hücreler ve mukoza-ilişkili değişmez T (MAIT) hücreler gibi hücre gruplarını kapsamaktadır.

$\gamma\delta$ T hücre reseptörü (TCR) eksprese eden T hücreler fare ve diğer hayvanların periferik kan ve lenfoid organların % 5 oranında bulunurlar (Collins ve Kaufmann, 2001). Bu hücreler lenfoid dokularda DH morfolojisi oluşturabilen büyük granüler lenfositler olup, bazıları CD8⁺ fenotipindedir. Genel olarak $\gamma\delta$ T hücrelerinin MHC ile sınırlı olmadığı kabul edilir. Çoğunlukla sitotoksik T hücreleri gibi fonksiyon gösterirler (Raia, 2004). $\gamma\delta$ T hücreleri, işlenmemiş protein antijenleri ve küçük organik fosfat molekülleri gibi birçok antijeni tanıyabilir.

Farelerde yapılan çalışmalarda bu hücrelerin enfeksiyonun erken safhasında önemli rol oynadığı ortaya konmuştur (Dieli ve ark., 2003; Lee ve ark., 2004). Araştırmacılar, $\gamma\delta$ T hücrelerinin insanlarda akut *B. melitensis* enfeksiyonu sırasında arttığını göstermiştir (Bertotto ve ark., 1993).

$\gamma\delta$ T hücreleri CD1 ailesinin bir kısmı dahil olmak üzere polimorfik olmayan antijen sunan moleküller tarafından kısıtlanmıştır. Bu nedenle, sadece enfeksiyona karşı primer yanıtta önemli rol oynayabilen, doğal ve nonspesifik bir immün yanıtı temsil edebilirler. Bu hücre tipi, antijen sunumuna ihtiyaç duymaz ve hızlı IFN- γ salınımı ile enfeksiyona hemen cevap verebilir (Angulo and Swerdlow, 1995).

İnsanda *Brucella* fosfoantijenleri, enfeksiyonun erken safhasında V γ 9V δ 2 T hücrelerini aktive eder. Periferal kan V γ 9V δ 2 T hücreleri akut brusellozlu hastalarda artmış ve tedavi sonrası düşüş göstermiştir. V γ 9V δ 2 T hücrelerinin temas-bağımlı ve bağımsız mekanizmalar aracılığıyla *Brucella* gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu durum, granül ve FasL aracılı sitotoksinite, makrofaj aktivasyonu, IFN- γ aracılı bakterisidal etki, granülosin ve katelisidin gibi bakterisidal faktörlerin salınımı ile gerçekleşir. Ayrıca güncel çalışmalar enfekte insan makrofajlarındaki V γ 9V δ 2 T hücrelerin anti-*Brucella* etkisinde NKG2D reseptörlerinin endükleyici rolleri olabileceğini göstermiştir. Bazı veriler ise $\gamma\delta$ T hücrelerinin immünolojik hafıza gösterebileceğini ve bu nedenle aşılama için önemli hedefler olabileceğini düşündürmektedir.

NKT hücresi, doğal öldürücü hücre soyunun bir veya daha fazla markerine sahip bir CD3⁺ T hücresidir. Bu hücre tipi baskın olarak karaciğerde bulunur ve sadece sınıf II CD1 moleküllerinin (insanlarda CD1d, farelerde CD1) aracılık ettiği antijen sunumuna cevap verir (Bendelac ve ark., 1995; Seki ve ark., 2000). NKT hücresi, antijen sunan makrofajlardan IL-12 üretimini endükler ve Th1 benzeri immün yanıtlar oluşturarak NK hücre aktivitesini up-regüle edebilir (Eberl ve ark., 2000; Lee ve ark., 1998).

En iyi bilinen CD1d bağımlı NKT hücre alt grubu iNKT hücrelerdir ve *invariant* T hücre reseptör α zinciri eksprese ederler. Dışarıdan gelen tehlike sinyallerine ve pro-enflamatuvar sitokinlere hızlıca yanıt oluşturmaları açısından önemlidirler. Bu hücreler, kronik enflamatuvar hastalıklarda (otoimmün hastalıklar, astım ve metabolik sendrom) da etkin bir role sahiptir. İnsan hücreleri üzerindeki in vitro çalışmalar, NK

ve CD4⁺ iNKT hücrelerinin, sitotoksik aktivite ve IFN- γ salınımı yoluyla *Brucella*'ya karşı antibakteriyel immün yanıt katkısını da göstermiştir.

MAIT hücreler, değişmez $\alpha\beta$ TCR eksprese eden bir T hücre alt grubudur. Bu hücreler, riboflavin (vitamin B₂) sentez yolağının fungal ve bakteriyel metabolitlerini tanıır. Bu metabolitler, *non-polimorfik* sınıf I MHC-benzeri molekül olarak adlandırılan MHC sınıf I ilişkili protein 1 (MR1) aracılığıyla sunulur. MR1 ligandları ubikitözdür ve kommensaller de dahil olmak üzere birçok bakteride bulunabilir. Riboflavin biyosentez yolağı MAIT hücre ligandlarını sağlar. Bu yolak, MAIT hücrelerini aktive eden mikroplarda etkinlik gösterebilir. En iyi tanımlanmış MAIT hücreler CD8⁺ T hücrelerdir ve mikrobiyal riboflavin türevlerinin MR1 sınırlı sunumu ya da direkt olarak IL-12 ve IL-18 sitokinlerinin uyarımı ile aktive olurlar. MAIT hücreler, IFN- γ ve TNF gibi enflamatuvar sitokinlerin salınımı ve enfekte hücrelere karşı sitotoksosite gösterilmesi gibi efektör fonksiyonlara sahiptir. Bu hücreler birçok bakteriyel zincire ve mayalara yanıt oluşturabilir; *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* ve *Saccharomyces cerevisiae* bunlardan bazılarıdır. *In vivo* ortamda MAIT hücrelerin anti-bakteriyel immünitedeki rolünü test etmek için yapılan bir çalışmada MR1^{-/-} fareler kullanılmış ve farelerin *K. pneumoniae*, *Mycobacterium bovis*, *Francisella tularensis* enfeksiyonlarının kontrolünde başarılı olamadıkları gözlenmiştir (Chua ve ark., 2012). Çalışmanın sonunda, MAIT hücrelerin MR1 bağımlı yoldan IL-12 ve IL-18 kombinasyonu ile aktive edilebileceği ve bu durumun immünoterapide kullanılabilir olacağı öngörülmüştür.

2.12.2. Brusellozda Edinsel İmmün Yanıt

2.12.2.1. Hümorale İmmün Yanıt

B lenfositler, edinsel immün yanıtın antijene özgü antikor üretimi ile karakterize olan hümorale kolunu yönetir. Bu hücrelerin nötralizan etkilerinin yanı sıra ürettikleri antikorlar sayesinde opsonizasyon ve bakteri fagositozuna, kompleman aktivasyonu, makrofaj, nötrofil ve NK hücre aracılı antikor bağımlı hücrele sitotoksosite (ADCC), antijen sunumu gibi olaylarda da önemli rolü vardır (Baldwin ve Goenka, 2006). Hücre

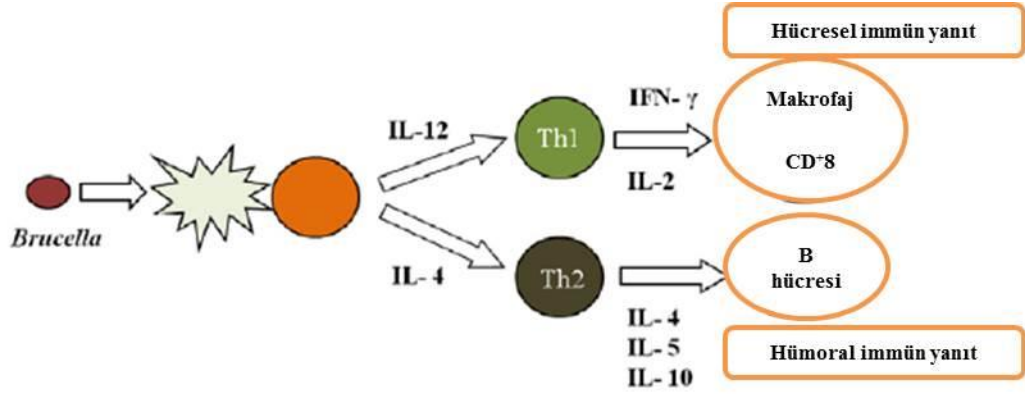
içi bakteriyel enfeksiyonlara karşı hümoral immünitinin rolü sınırlıdır ve koruyucu değildir. Antikor aracılı opsonizasyon (IgM, IgG1, IgG2a, IgG3) bakterinin fagositik alınımını destekler ve *Brucella* enfeksiyonunu başlangıç safhasında sınırlar ancak hücre içi etkisi azdır.

Güncel çalışmalarda, brusellozlu B hücre-eksik farelerde konak savunmasında Th1 yanıtlarının kritik rolü gösterilerek B hücrelerin regülatör rolüne yeni bir bakış açısı getirilmiştir. Hastalığın erken fazı süresince B hücreler IFN- γ aracılı Th1 yanıtlarına katılan ve enfeksiyon devamlılığını destekleyen IL-10 ve *transforming growth factor-beta* (TGF- β) üretir. Brusellozda B hücrelerin yokluğu antikor bağımsız hücre yanıtı ile ilişkilendirilmiştir (Goenka ve ark., 2011).

B hücrelerin brusellozdaki rolünü anlamaya yönelik çalışmalarda; opsonize *B. abortus*'un farelerde B hücreleri enfekte ederek yaşamını sürdürdüğü ve yüksek düzeyde IL-10 salınımını endükleyen virülans faktörü prolin rasmaz (PrpA) eksprese ettiği gözlenmiştir. B hücre proliferasyonu, makrofajlar ile etkileşime giren ve kronik enfeksiyonun oluşturulması için gerekli olan birkaç çözünür faktörü serbest bırakan *Brucella* virülans faktörü PrpA'nın salgılanmasıyla başlatılır. Ayrıca, *Brucella* PrpA bağımlı enfeksiyonun erken evrelerinde IFN- γ , TNF- α , IL-10 ve TGF- β 1 sitokin seviyelerini değiştirir (Spera ve ark., 2006). Son çalışmalar, Br-LPS ve PrpA'nın konak immün mekanizmaları ile etkileşime girme yeteneğine sahip immünomodülatör moleküller olduğunu açıklamaktadır. Bu moleküller IFN- γ 'nın salınımını inhibe ederken IL-10'un salınımını arttıırırlar.

2.12.2.2. Hücresel İmmün Yanıt

Doğal immünite her ne kadar enfeksiyonun akut fazında *Brucella* replikasyonunu kontrol etse de kronik fazda daha iyi düzenlenmiş bir edinsel immün yanıtı ihtiyaç vardır (Baldwin and Goenka, 2006). Hücresel immünitinin temel hücreleri CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleridir. ASH'lerin aktivasyonunu takiben naif Th0 hücreler sırasıyla IL-12 ve IL-4 uyarımı aracılığıyla Th1 ve Th2 alt gruplarına farklılaşır (Şekil 6). CD8⁺ T hücreler ise sitotoksik lenfositler halini alır. Th1 hücreler, IFN- γ ve IL-12 üretimi ile hücre aracılı immüniteyi aktive ederken, Th2 hücreler IL-4, IL-5 ve IL-10 üreterek hümoral immüniteyi aktive eder.



Şekil 6. *Brucella* enfeksiyonunda immün sistem hücrelerinin farklılaşması (Goldings ve ark.,2001)

Brucella, konak savunma mekanizmalarından kaçmak için çoklu stratejiler geliştirmiştir ve kronik enfeksiyon gelişmesini destekler (Monack ve ark., 2004). Enfeksiyon başlangıcında ve edinsel immün yanıtların kontrolünde DH gibi hücreler önemli rol oynar (Kapsenberg, 2003). Bazı güncel çalışmalarda, bu patojenin DH'lerde proliferasyonunu ve *Brucella* ile enfekte DH'lerde MHC sınıf II, CD80 ve CD86 ekspresyonunun azaldığını göstermektedir (Billard ve ark., 2007). *Brucella*'nın klirensi için IFN- γ aracılı tip I immün yanıtlara ihtiyaç vardır (Goenka ve ark., 2011). *Brucella*, IFN- γ aracılı MHC sınıf I ve MHC sınıf II ekspresyonunu düzenler, sitokin regülasyonuna bağlı bir mekanizmadır (Gentilini ve ark., 2015); MHC sınıf I ve II'nin inhibisyonuyla sonuçlanır (Barrionuevo ve ark., 2013).

Brusellozda, edinsel immün yanıt mekanizmaları üç temel basamağa ayrılır; ilk basamakta, *Brucella*'nın hücre içi yaşamı inhibe edilir, makrofajlarda bakterisidal fonksiyonu CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreler IFN- γ üretir. İkinci olarak, enfekte makrofajlar sitotoksikiteye sebep olan CD8⁺ T hücrelerce öldürülür. Üçüncüsü, endositik kısımda *Brucella*'nın opsonizasyonu fagositozu destekleyen IgG2a ve IgG3 ile olur (Goenka ve ark., 2011; Martirosyan ve ark., 2011). Ayrıca, IL-12, IFN- γ ve TNF- α brusellozda anahtar sitokinlerdir, doğal ve edinsel immün yanıtı başlatarak immün ilişkili hücelere komut verirler.

Brucella konakta kronik enfeksiyon oluşumuna sebep olacak şekilde yaşamını devam ettirir. Kronik brusellozda immünsüpresif etki, efektör T lenfositlerin regülasyonunda önemli rol oynayan CD4⁺ CD25⁺ T hücrelerinin artışıyla oluşur (Pasquali ve ark., 2010). *Brucella*, IL-12 salınımını ve enfekte DH'lerin T hücre

uyarımını önleyerek koruyucu Th1 immün yanıt oluşumuna müdahale eder (Salcedo ve ark., 2008). Sonuç olarak DH'lerin olgunlaşma kapasitesi MHC sınıf II molekülünün ekspresyonuna bağlı olarak azalır (Billard ve ark., 2007; Salcedo ve ark., 2008). Olgunlaşmamış DH'ler tolerojenik özelliklere sahiptir ve *Brucella* bu özellikleri DH aktivasyonunu inhibe ederek immün yanıtları bozmak için kullanır. Tolerans başlangıcının DH'lerle sınırlı olmadığını gösteren kesin kanıtlar vardır, ancak tam olarak olgunlaşmış DH'ler, uzun süreli kronik enfeksiyonun ortaya çıkmasına neden olan toleransı endükleyebilmektedir (Lutz ve Schuler, 2002). Ayrıca, olgunlaşmamış DH'lerin CD4⁺ naif T hücrelerle etkileşimi, Treg (T regülatör) hücrelerin düzenleyici etkisini endükleyebilir ve TGF- β bağımlı Th1 yanıtını önler, bu durum insanda kronik bruselloz vakalarında gözlenmiştir (Elfaki ve Al-Hokail, 2009).

Brucella ile enfekte makrofajlar, konağın immün yanıtını uyaran antijeni sunmak için DH'leri aktive eder (Billard ve ark., 2007). CD4⁺ T hücrelerinin olgunlaşmamış DH'lerle etkileşimi, CD8⁺ sitotoksik T hücre uyarımı için gerekli sinyalleri oluşturamaz. IL-10 seviyesinde azalma, konakta *Brucella*'ya karşı direnç mekanizması geliştiğini gösterir (Smith ve ark., 2004). Bu bulgular *Brucella*'nın antijen sunumunu engellediğini ve doğal ve edinsel immün mekanizmalar arasındaki etkileşimde önemli rol oynadığını göstermektedir.

Br-LPS'si, edinsel immün yanıt ve T hücrelere antijen sunumunun başlamasına yardımcı olan yapısal ve davranışsal farklılıklara sahiptir (Conde-Alvarez ve ark., 2012). LPS, makrofaj hücre yüzeyine antijen yüklenmesi ve işlenmesi için özelleşmiş bölgeler olan bölümlerden geri dönüştürüldükten sonra makrodomen kümelerini oluşturur. Bu makrodomen kümeleri, Br-LPS, MHC sınıf II molekülleri ve lipid rafları içerir. MHC sınıf II molekülleri, immün yanıtın başlatılmasını kolaylaştıran kompleksler oluştururken, *Brucella* LPS'si Th1 tip yanıtları zenginleştirir (Lapaque ve ark., 2006). Br-LPS'nin PKMH'lerce üretilen IL-10'u endüklediği de raporlanmıştır. Edinsel immün yanıt, bakterilerin yok edilmesi ve konağı koruma amaçlı doğal immün yanıtın aktivasyonundan sonra etkinleşmeye başlar. Brusellozda edinsel immünitenin Th1 tipi ile ilgili çalışmalar sonucu:

-Th1'in anahtar elemanları olan IFN- γ , IRF-1 ve IL-12 eksik farelerde enfeksiyona hassasiyet geliştiği (Brandão ve ark., 2012),

-Th1 ilişkili sitokinlerin (IFN- γ ve IL-12) kontrolü ile farelerde bir korunma

mekanizması olduğu (Martirosyan ve ark., 2011),
-Çeşitli antijenlerin in vitro'da stimülasyonu sonrası, fare splenositleri ve CD4⁺ T hücreleri sığır CD4⁺ T hücreleri ve insan PKMH'leri ve T hücreleri ile IFN- γ sekresyonu gerçekleştiği,
-Bruselloz hastalarında Th1 tip yanıtların sergilendiği ve azalan Th1 yanıtları ile kronik/relaps hastalık arasındaki korelasyon olduğu (Akbulut ve ark., 2005),
-Hastalığa duyarlılıkla ilişkili veya polimorfizmlerle meydana gelen genetik farklılaşmalar ve Th1 tipi yanıtlara dahil moleküllerde mutasyonlar olduğu (Skendros ve ark., 2011) gözlenmiştir.

Bakteriyel antijenler MHC sınıf II yoluyla CD4⁺ T hücrelerine sunulur. Bu olay bruselloza karşı savunmada primer önemi olan CD4⁺ T hücrelerin aktivasyonu ile sonuçlanır. CD4⁺ T hücrelerinin rolü, birçok hücre içi patojen açısından yaygın olarak değerlendirilmiştir. Hücreiçi patojenlere karşı savunmada IFN- γ üretimi, bu hücreler için en önemli efektör mekanizmayı oluşturmaktadır. CD4⁺ T hücrelerin IFN- γ ürettiğinin keşfedilmesinden sonra etkili bir primer immün yanıtın CD4⁺ T hücrelere bağlı geliştiği anlaşılmıştır. Ayrıca, kronik brusellozlu hastalarda CD8⁺ T hücrelerinin proliferasyonu tanımlanırken; CD4⁺ T hücrelerinin kronik brusellozda gelişmediği gösterilmiştir.

Çalışılan fare modellerinde enfeksiyona karşı direnç veya iyileşme direnci genellikle mononükleer fagosit sisteminin, özellikle dalağın organlarındaki koloni oluşturan birimlerin (CFU) belirlenmesiyle değerlendirilir. Pavlov ve arkadaşları tarafından yapılan deneyler, T hücrelerinin farelerde *Brucella*'nın temizlenmesi için gerekli olduğunu ve bu gereksinimin antikor üretimi için T hücresi yardımı ile ilişkili olmadığını göstermiştir. Buna göre, Br-LPS'ye karşı antikor cevabının T hücresinden bağımsız olduğu anlaşılmıştır (Gill ve ark.,1992).

Brucella immünolojisinde IFN- γ rolünün kısmi de olsa açıklanması, bu hastalıkta T hücrelerinin merkezi rolünü ortaya koymuştur. Elde edilen tüm veriler, CD4⁺ T hücresinin brusellozda IFN- γ 'nın en büyük üreticisi olduğunu göstermektedir.

Zhan ve ark. yaptıkları çalışmada, *Brucella* ile enfekte farelerin dalak hücrelerinde *Brucella* antijenlerine yanıt olarak IFN- γ ve IL-12 üretildiğini göstermiştir. Ayrıca, çözümlü *Brucella* proteinleri (SBP) ile immünize edilmiş farelerin dalak hücrelerinde ise önemli miktarda IL-12 üretilirken, IFN- γ üretiminin göz ardı edilecek kadar az

olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmanın sonuçları, antijen formunun immün yanıt oluşumunda önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir.

CD8⁺ T hücreler, MHC sınıf I aracılığı ile sunulan ve ASH'lerin sitoplazmasından kaynaklanan antijenleri tanırlar. Bruselloz gibi bakteriyel enfeksiyonları sitokin salınımı, sitotoksinite ya da mikrobisidal aktivite ile kontrol ederler. Bu hücreler IFN- γ ve TNF- α gibi tip I sitokinlerin kaynağı olarak fonksiyon göstermelerinin yanı sıra dokulardaki enfekte makrofajları öldürerek koruyucu etkiye katılabilirler.

Makrofajların aktivasyonu nitrik oksit (NO) gibi reaktif oksijen ara ürünlerinin (ROI) üretimine yol açan nitrik oksit sintaz (iNOS) üretiminin artışı ile sonuçlanır. Bu durum bakterilerin azalmasını sağlar. CD8⁺ T hücreler, perforin aracılı mekanizmalarla enfekte makrofajları öldürebilirler. Perforin, CD8⁺ T hücrelerin granüllerinde bulunan bir protein olup, enfekte makrofajların membranlarında porlar oluşturur ve bu hücrelerin apoptozu ya da lizisi ile sonuçlanan granzim A, granzim B, granülozin gibi toksik proteinlerin girişine izin verir. Makrofaj apoptozu aynı zamanda enfekte makrofajların üzerindeki Fas ile aktive CD8⁺ T hücrelerin üzerindeki FasL'ın bağlanmasıyla endüklenebilir. CD8⁺ T hücreler içerdikleri granülozin proteini sayesinde direkt mikrobisidal etki de gösterebilir.

Brucella ile enfekte fare modellerinde, hem primer hem de sekonder immünitede CD8⁺ T hücrelerinin önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Makrofajlardaki *B. abortus*, farelerde ve insanlarda sitolitik CD8⁺ T hücrelerinin aktivasyonu ve proliferasyonu için uygun koşullar oluşturur (Huang ve ark., 1999). Bu koşullar, özellikle makrofajlar tarafından IL-12 salınımı ile sağlanır ve *Brucella* antijenlerine yanıt olarak sitokin üretimi endüklendir. MHC sınıf I ve CD8 kısıtlı olduğu bilinen bir insan immün yetmezlik virüsü (HIV) peptidi, ısıyla öldürülmüş *B. abortus*'a konjuge edilmiş ve farelerde spesifik sitolitik CD8⁺ T hücrelerini endüklediği gösterilmiştir (Lapham ve ark., 1996).

Genel görüş peptidlerin, antijen işlenmesi ile ilişkili taşıyıcı tarafından endoplazmik retikuluma taşınmak üzere sitoplazmaya ulaşması ve daha sonra MHC sınıf I molekülleri ile sunulması gerektiği yönündedir. Ancak yapılan çalışmaların sonucu bu görüşe farklı bir bakış açısı sağlayarak bruselloz için koruyucu bellek CD8⁺ T hücrelerinin aşılama yoluyla endüklenebileceği olasılığını ortaya koymaktadır.

2.12.3. Regülatör T (Treg) Hücre/ Th17 Hücre Dengesi

Treg hücreler, CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T hücrelerin negatif düzenleyici işlevleri olan bir alt kümesidir. Bu hücreler, IL-10, TGF- β ve sitokinlerin salınımıyla immünsüpresif etki gösterirler. IL-17, Th17 hücrelerce salınan karakteristik bir sitokindir; organizmaların immün homeostazının devamlılığında önemli rol oynayarak patojenik mikropların yayılımını önler. IL-17, bruselloza karşı koruyucu immün yanıtta da görev alır (Pasquevich ve ark., 2011).

Treg/Th17 hücre dengesi, immün kaçış aracılı enflamasyon ve patogenezin kontrolünde önemlidir (Yan ve ark., 2015). Tümör oluşumu, enflamatuvar yanıtlar veya otoimmün hastalıkların varlığında Treg/Th17 hücre dengesi bozulur ve çeşitli hastalıklar gelişir. Wang ve ark., *Brucella* ile enfekte farelerde, IL-10 eksprese eden Treg hücrelerin, *Brucella* gelişimini ve yayılımını destekleyerek, makrofajlar ve başlatıcı proenflamatuvar/anti-enflamatuvar sitokinler arasında fonksiyonel denge bozukluğuna sebep olduğunu göstermiştir (Wang ve ark., 2014).

Çalışmalarda, *Brucella* M5-90 dış membran proteini ile bağışıklanan koyunda, Treg hücrelerin immünsüpresif etki gösterdiği raporlanmıştır. Ayrıca, Treg hücrelerin azaldığı durumlarda IFN- γ , CD4⁺ Thücre ve CD8⁺ T hücre immün yanıtları gelişmiştir (Wang ve ark., 2014). Araştırmacılar, brusellozun Treg/Th17 hücre dengesizliği ile ilişkili olabileceğini öne sürmüştür. Hastalığın oluşumu ve gelişimi ile ilgili Treg/Th17 denge bozulması ile endüklenen immün mekanizmanın tipi çok net değildir. Bu konu ile ilgili daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır.

2.12.4. Bruselloz ve otofaji

Otofaji, dinamik, hücreSEL ve homeostatik bir süreçtir. Çift membranlı veziküllerle ayrılmış sitoplazmik hedefler otofagozomlar olarak adlandırılır ve degradasyon için lizozomlara gönderilir. Otofaji önemli bir doğal immün mekanizmadır ve çeşitli hücre içi patojenlerini otofagozomlarda hidrolitik degradasyon aracılığıyla direkt elimine eder. ASH'ler patojenin yutulması, TLR sinyalizasyonu ve Th1 hücrelerince IFN- γ salınımı, hücre içi bakterilere karşı otofajik mekanizmanın potansiyel uyarıcılarıdır.

Yapılan çalışmalarda, *in vitro*'da otofajinin farmakolojik inhibisyonunun *B. melitensis*'in hücre içi replikasyonunu önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir.

Hücre içi patojenler, konağın otofajik yolağına katılmak için, membran hasarlama, hücresel tanınmadan kaçma ve replikatif mekanizmaların gelişmesi gibi çeşitli stratejiler geliştirmiştir. *Brucella* replikasyonu için (rBCV) endositik kompartmanla ER füzyonu, veziküler taşınmayı sağlayan Sar1 ve Rab2 proteinlerine bağımlı gerçekleşir. Brusellozun erken evresi boyunca, makrofajlar ve epiteloid hücrelerde, rBCV, otofajik BCV (aBCV) olarak bilinen özelleşmiş yapılara çevrilir. Son çalışmalar, otofaji ilişkili proteinlerin rBCV biyogenezinde önemli rol oynadığını ve hücre içi yaşam döngüsünün tamamlanmasını desteklediği yönündedir (Starr ve ark., 2008, 2012). Bunun yanında, rBCV'den aBCV'ye dönüşüm, BECLIN1, PI3K, ULK1 ve Atg14L gibi otofaji başlatıcı proteinlere bağımlıdır ancak otofagozom oluşumunun durması için Atg5, Atg7, LC3B, Atg4B ve Atg16L1 otofaji uzama proteinlerine ihtiyaç vardır (Starr ve ark., 2012). Otofaji mekanizması tam olarak anlaşılacakla birlikte, yapılan bir çalışmada, otofagozom gelişimi BECLIN1 ve PI3K kompleks oluşturduğunda endositik bölgede başladığı ancak Atg14L'deki tükenmenin ER'de yer alan BECLIN1 kompleksinden başlayan aBCV oluşumunu azalttığı gözlenmiştir (Starr ve ark., 2012). *Brucella*'da doğal ve edinsel immün mekanizmalarda otofajinin rolünü araştırmak için daha fazla çalışma gereklidir.

2.12.5. Bruselloz ve apoptoz

Apoptoz, programlı hücre ölümünün genellikle kaspaz aracılı ve hücre içi bakterilere karşı savunmayı destekleyen iyi düzenlenmiş bir yoldur. Apoptoz, sitokrom c'nin mitokondriyal salınımını ve kaspaz 9'un aktivasyonunu kapsayan hücre içi sinyallerle ya da hücre yüzeyinde eksprese edilen ölüm reseptörlerinin stimülasyonu ve kaspaz 8'in aktivasyonunu sağlayan hücre dışı sinyallerle tetiklenen bir yol ile gerçekleşir. Granüloma içindeki makrofajlar, pro-apoptotik molekül Bax'ı eksprese ederler, anti-apoptotik olan Bcl-2'yi eksprese etmezler. Bax, granüloma içinde meydana gelen hipoksi gibi stres faktörleri tarafından düzenlenen hücre içi sinyallerle uyarılan apoptoz yolunu aktive eder. Ayrıca makrofajların çevresinde

bulunan lenfositler üzerinde TNF- α ve FasL ekspresyonunun artması, p55, TNFR ve Fas ölüm reseptörlerini uyarır (Fairbairn, 2004).

Apoptoz inhibisyonu, *Brucella* bakterisinin hücre içinde replike olmak için kullandığı stratejiler arasındadır. *Brucella*, enfekte makrofajlarda kimyasal uyarıların endüksiyonu ile apoptotik mekanizmayı inhibe eder. Yapılan çalışmalarda, *B. melitensis* enfeksiyonunda, mitokondrideki apoptotik yolağa dahil genlerin ekspresyonunda azalma olduğu gözlenmiştir (He ve ark., 2006). Bruselloz boyunca spesifik kalsiyum bağımlı yolda Nedd4 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein*) aktivitesi artmıştır. Nedd4 ile tedavi edilen *Brucella* ile enfekte makrofajlar, bu aktiviteyi azaltır ve bu da kalpain 2 yıkımını durdurur ve makrofajların apoptozuna yol açar (Cui ve ark., 2014). Kaspaz-2, apoptoz ve piroptozda makrofaj ölümüne neden olan birçok genin ve yolağın düzenlenmesinde rol oynar (Bronner ve ark., 2013). Ayrıca, A20 (endotelial hücrelerde TNF yanıtlayıcı gen)'nin upregülasyonu, kaspaz-8'e bağlı makrofaj hücre ölümünü sınırlandıran ve hücre içi bakteri büyümesini destekleyen NF- κ B'nin inhibisyonuna yol açar (Wei ve ark., 2015). Kullanılan bir diğer önemli stratejide makrofajın hücre ölümünün inhibe edilerek virülansı arttırmak için *Brucella*-makrofaj etkileşimine izin verilmesidir.

Brucella'nın replikasyon için makrofajlar içine girmesinden sonra, patojen direkt olarak bakteriyel çıkış ve yayılmayı destekleyen makrofaj sitotoksitesi ile sonuçlanabilecek mutanlara dönüşür (Pei ve ark., 2014). Br-LPS, TNF- α salınımına bağlı olarak T hücrelerin apoptozunu artırır (Velasquez ve ark., 2012). Ayrıca, *Brucella* ile enfekte edilmiş nötrofiller ve monositler, brusellozda apoptozisin inhibisyonu ile sonuçlanan, CD106 ve CD54 gibi çeşitli adezyon moleküllerinin belirgin şekilde artmasını sağlar (Scian ve ark., 2013).

2.13. Sitokinler

2.13.1. Genel Özellikleri

Sitokinler immün yanıt sırasında hücreler arası iletişimi sağlayan moleküllerdir. Protein veya peptid yapıda olup bazıları glikozillenmiştir. Lenfositlerin büyüme ve farklılaşmasında, antijenlerin eliminasyonunda, hematopoetik hücrelerin gelişiminde

rol oynarlar. Genel anlamda biyolojik yanıt düzenleyicileridir (Abbas ve ark., 2007; Roitt ve Male, 1993). Sitokinlerin salgılanması kısa ve kendini sınırlayan bir olaydır. Sitokinler genellikle depolanmaz, hücrel aktivasyona bağlı yeni mRNA sentezi sonucunda geçici olarak üretilir (Grossi ve Lydyard, 1993; Kılıçturgay, 2003). Üretilen mRNA düzeyi post-transkripsiyonel mekanizmalar aracılığıyla sıkıca kontrol edilir. Sitokinler sentezlendikten sonra hemen salınır. Her sitokinin birçok biyolojik etkisi mevcuttur (pleotropizm) (Kılıçturgay, 2003). Ayrıca sitokinler aynı veya benzer birden fazla biyolojik etkileri paylaşır (*redundancy*). Uyarana yanıt olarak geçici şekilde üretilir. Sitokinler üretildikleri hücreye (otokrin) veya üreticinin hemen yakınındaki hücreye (parakrin) etki gösterir (Abbas ve ark., 2007; Feldman, 1993; Kılıçturgay, 2003). Sitokinler pleotropik etkilerinden dolayı pek çok farklı biyolojik etkilere sahiptir. Bu onların tedavide kullanımlarını sınırlayan en önemli unsurdur. Redundancy özelliğinden dolayı tek bir sitokin geni çalışmayan canlılarda işlev bozukluğu saptanmayabilir (Feldman, 1993; Kılıçturgay, 2003).

Sitokinler diğer sitokinlerin sentez ve etkilerini düzenler. Bir sitokinin diğer sitokinin etkilerini düzenlemesi şelale benzeri aktivasyona neden olur. Aktive olan ikinci ve üçüncü sitokin ilk sitokinin biyolojik etkilerini artırır, azaltabilir (Abbas ve ark., 2007; Kılıçturgay, 2003). Sitokinler kendi etkilerini, diğer polipeptid hormonlar gibi hedef hücre yüzeyindeki özgül reseptörlere bağlanarak başlatır (Densen, 2000; Feldman, 1993; Glickman ve Pamer, 2000). Sitokinler, reseptörlerine çok yüksek afinitelerle bağlanır, dolayısıyla bir görevi yerine getirmek için çok düşük miktarlardaki sitokin düzeyleri bile yeterli olabilir. Çoğu hücre çok az sayıda sitokin reseptörü barındırır, yüksek afiniteli bağlanma nedeniyle biyolojik etkinliklerinin ortaya çıkması için bu yeterlidir (Abbas ve ark., 2007; Feldman, 1993; Kılıçturgay, 2003).

Dış sinyaller sitokin reseptörlerinin ekspresyonunu dolayısıyla da hücrelerin sitokinlere yanıtını etkilerler. T veya B lenfositlerin antijenlerle uyarımı sitokin reseptör ekspresyonunu artırır (Abbas ve ark., 2007; Grossi ve Lydyard, 1993). Bu nedenledir ki immün yanıt sırasında antijene yanıt veren lenfositlerin sayısı artar. Reseptör ekspresyonu sitokinlerin kendileri tarafından da düzenlenir. Çoğu sitokine karşı hücrel yanıt hedef hücredeki gen ekspresyonunun değişikliği, yeni işlevlerin ortaya çıkması ve hedef hücrelerin proliferasyonundan oluşur (Abbas ve ark., 2007;

Feldman, 1993). Kemokinlerin yeni protein sentezi olmadan hücre göçüne neden olması ve TNF'nin yeni protein sentezi olmadan hücre ölümü endüklemesi ise istisna durumlarıdır (Abbas ve ark., 2007; Kılıçturgay, 2003).

2.13.2. Sınıflandırma

Spesifik reseptörlere bağlanan ve lökositler arasında hücre içi iletişimi sağlayan protein yapıları interlökin olarak adlandırılmıştır. İnterlökinler, her bir aileye, dizi homolojileri, reseptör zincir benzerlikleri ve fonksiyonel özelliklerine göre atanır. Son 10 yılda Th subsetlerinin keşfi ile birlikte, (Akdis ve ark., 2011; Lloyd ve Saglani, 2013) hemen hemen tüm immün hücrelerin CD4 ve CD8 T hücreler, B hücreler, ILCs (Innate Lenfoid Cells), NK hücreler ve DH'ler gibi belirgin yüzey reseptörleri ve sitokin profilleri ile karakterize farklı fonksiyonel alt gruplar sergilediği görülmüştür (Akdis ve Akdis, 2014; Christianson ve ark., 2015).

İmmün ve enflamatuvar hücre fonksiyonlarının mekanizmaları ile ilgili araştırmalar interlökinlerin sayısında giderek artan bir tablo olduğunu ortaya koymuştur. Sitokin aileleri yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre farklı interlökin grupları içermektedir (Tablo 2). Günümüzde 40'ın üzerinde interlökin grubu tanımlanmış olmakla birlikte bu konudaki çalışmalar devam etmektedir.

Ayrıca sitokinler konaktaki mikrobiyal aktivitelere göre de gruplandırılmaktadır. Bu sitokin grupları konaktaki enfeksiyonun tanınması ve enfeksiyona karşı yanıt oluşturulması sürecinde oldukça önemli rol oynamaktadırlar.

Tablo 2. Sitokinlerin sınıflandırılması

IL-1 sitokin ailesi	Ortak γ zincirli sitokin ailesi	IL-10 sitokin ailesi	IL-12 sitokin ailesi	Tip 2 İmmün yanıt sitokinleri	Kemokin aktivite interlökinleri	IL-17 sitokin ailesi	Diğer interlökinler
IL-1- α	IL-2	IL-10	IL-12	IL-4	IL-8	IL-17 A	IL-3
IL-1- β	IL-4	IL-19	IL-23	IL-5	IL-16	IL-17 B	IL-6
IL-18	IL-7	IL-20	IL-27	IL-9		IL-17 C	IL-11
IL-33	IL-9	IL-22	IL-35	IL-13		IL-17 D	IL-14
IL-36 α	IL-15	IL-24	IL-39	IL-25		IL-17 E	IL-32
IL-36 β	IL-21	IL-26		IL-31		IL-17 F	IL-34
IL-36γ		IL-28		IL-33			IFN- γ
IL-1Ra		IL-29					IFN- α
IL-36Ra							IFN- β
IL-37							TGF- β
IL-38							TNF- α

2.13.3. Proenflamatuvar Sitokinler

Fagositik hücreler tarafından *Brucella* bakterisinin tanınması, hücre aktivasyonuna ve çok sayıda sitokin üretilmesine sebep olur. Enflamatuvar cevapta ve bakteriyel enfeksiyonların seyrinde önemli rol oynayan bu sitokinlerden bu çalışmada kullanılanlar aşağıda özetlenmiştir.

2.13.3.1. İnterlökin 36 (IL-36)

IL-36, IL-1 sitokin ailesinin yeni bir üyesidir. İlk olarak 1999'da IL-1'in homoloğu için DNA databazları üzerinde araştırılırken tanımlanmıştır. IL-36 sitokini, 4 üyeden oluşur; IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36R sinyalizasyonunun aktivasyonunu inhibe eden IL-36 reseptör antagonisti (Ra). IL-36 sitokinleri, IL-36R'üne bağlanır ve IL-1 reseptör aksesuar proteinini (IL-1RAcP) bir ko-reseptör olarak kullanır. Fonksiyonel olarak IL-36 sitokinleri, enflamasyonun tipine ve yerine bağlı olarak olası farklı işlevlerle pro-enflamatuvar etki gösterir. IL-36 sitokinleri keratinositler, bronşiyal epitelyum, nöron hücreleri, gliyal hücreler, DH'ler ve makrofajlar gibi farklı birçok hücre tipinde eksprese edilir. IL-36 sitokinlerinin homeostaz ve ilişkili dokuların enflamasyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Towne ve Sims, 2012; van de Veerdonk ve Netea, 2013). Derideki keratinositlerde aşırı ekspresyon ve insan psöriyatik deri lezyonlarında Th1 ve Th17 sitokinleriyle ilişkili olarak IL-36 sitokinleri en iyi psöriyazis modellerinde tanımlanmıştır (Towne ve Sims, 2012). Ayrıca, IL-36 sitokinleri mikrobiyal enfeksiyonlarca endüklenmiş çeşitli enflamatuvar sinyallere de yanıt vermektedir ve bu sitokinlerin anti-mikrobiyal enflamasyonda görev aldığı gösterilmiştir (Segueni ve ark., 2015). Son yıllarda IL-36 ailesi sitokinlerinin patolojik etkileri birçok enflamatuvar hastalığı (psöriyatik artrit, sistemik lupus eritamatozus (SLE), enflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), ülseratif kolit, Chron hastalığı) içine alacak şekilde genişletilmiştir (Blumberg ve ark., Frey ve ark., 2013; Friedrich ve ark., 2014 2007; Nishida ve ark., 2016; Towne ve Sims, 2012; van de Veerdonk ve Netea, 2013). IL-36 agonistleri (IL-36 α , IL-36 β ve IL-36 γ); IL-36R aracılı pro-enflamatuvar sinyal transdüksiyonunu başlatmak için aynı reseptör kompleksine (IL-1Rrp2 ve IL-1RAcP) bağlanır. Ayrıca, IL-36 agonistlerinin biyolojik fonksiyonları IL-36Ra

tarafından düzenlenir (Chustz ve ark., 2011; Dinarello ve ark., 2010).

IL-36R, IL-36 agonistlerini yanıtlar ve hem kemik iliği kökenli DH'ler hem de CD4 T lenfositlerde eksprese olur (Franzke ve ark., 2012). Yeni bulgular IL-36 sinyalizasyonunun, doğal ve edinsel immün yanıtların aktivasyonuna dahil olduğunu göstermektedir. DH'ler immün tolerans ve otoimmün enflamasyon arasındaki dengenin düzenlenmesinde immün sistemin doğal ve edinsel kollarını bağlayarak kritik rol oynar. T hücre farklılaşmasında önemli derecede etkinlik gösterirler. TNF- α ve Th17 sitokinlerinin (IL-17A, IL-22 gibi) IL-36 sitokinlerini direkt olarak endüklediği ve kendi ekspresyonlarını desteklediği gözlenmiştir. Ayrıca insan keratinosit kültür hücrelerinde TNF- α , IL-6 ve IL-8 gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimini, IL-36 ve Th17 sitokinleri arasında pozitif bir geri bildirim döngüsü yaratarak şekillendirdiği gösterilmiştir (Carrier ve ark., 2011).

IL-36'nın artan gen ekspresyonunun, psöriyatik hastaların deri lezyonlarındaki Th17 sitokinleri ile ilişkili olduğu raporlanmıştır (Carrier ve ark., 2011). Yapılan çalışmalar, IL-36 sitokinlerinin psöriyaziste Th1 ve Th17 yanıtlarını kullanarak patojenik bir rol oynadığını işaret etmektedir.

2.13.3.2. İnterlökin 39 (IL-39)

IL-12 ailesi, güncel olarak beş üyeden oluşur (Ramnath ve ark., 2015; Wang ve ark., 2016) ve bu üyeler naif T ve B lenfositlerin gelişimini etkileyerek hem pro-enflamatuvar hem de anti-enflamatuvar yanıtları düzenler (Sun ve ark., 2015; Wang ve ark., 2016). IL-12 ailesi sitokinleri bir α subuniti (p19, p28, p35) ve bir β zinciri (p40, Ebi3) içerir (Kastelein ve ark., 2007; Vignali ve Kuchroo, 2012). Bu ailedeki birleşme kuralları baz alındığında p19/Ebi3 eşleşmesinin mümkün olabileceği öngörülmüştür (Egwuagu ve ark., 2015; Kastelein ve ark., 2007; Ramnath ve ark., 2015; Vignali ve Kuchroo, 2012; Wang ve ark., 2012). IL-23p19/Ebi3 heterodimeri IL-39 olarak belirlenmiştir ve yapılan çalışmalarda p19 veya Ebi3'ün *knock-down* farelerde lupus hastalığını azalttığı sonucuna varılmıştır (Wang ve ark., 2016). Bu çalışmalar dahilinde IL-39'un aktif B hücrelerce sekrete edildiği ve nötrofillerin farklılaşması ve yayılımını endüklediği düşünülmektedir. Ayrıca, IL-39 endüklü nötrofiller aktif B hücrelerde IL-39 ekspresyonu üzerinde BAFF salınımı sayesinde

pozitif bir *feedback* yaratmıştır.

Tüm çalışmalar ele alındığında IL-39'un lupuslu farelerde nötrofillerin farklılaşmasını ve yayılımını endüklediği sonucu çıkmaktadır. Çalışma sonuçları IL-39'un pro-enflamatuvar bir sitokin olduğu yönündedir.

IL-39'un diğer bir adı da *metrnl*'dir. IL-39'un ekspresyonunun bariyer dokular (mukoza ve deri) ve M2 makrofajlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, IL-39'un psöriyazis ve romatoid artrit (RA) gibi çeşitli otoimmün koşullarda aşırı ekspresyonu raporlanmıştır (Sun ve ark., 2015). Yapılan deneylerde çeşitli sitokinlerin makrofajlarda IL-39 üretimini regüle ettiği gösterilmiştir. Örneğin, TNF- α ve IL-12, IL-39 ekspresyonu için güçlü endükleyiciler iken, TGF- β ve IFN- γ ise güçlü inhibitörlerdir.

2.13.4. Anti-Enflamatuvar Sitokinler

Brucella'nın başlattığı proenflamatuvar cevap, anti enflamatuvar mekanizmalarla antagonize edilir. Solübl sitokin reseptörleri, hücresele reseptörlere sitokinlerin bağlanmalarını engellerler ve böylece hücre içi sinyalizasyonu bloke ederler. Bu çalışmada kullanılan anti-enflamatuvar sitokinler aşağıda özetlenmiştir.

2.13.4.1. İnterlökin 35 (IL-35)

IL-35, IL-12 ailesine ait yeni tanımlanmış heterodimerik bir sitokindir. Bu aileye ait tüm üyeler bir α zinciri (p19, p28 veya p35) ve bir β zinciri (p40 veya EBI3) içerir ve heterodimerik moleküller, IL-12 (p35 / p40), IL-23 (p19 / p40), IL-27 (p28 / Ebi3), IL-35 (p35 / Ebi3), IL-39'un (p19 / Ebi3), IL-Y (p28 / p40) şeklinde bulunurlar. Zincir eşleşmelerindeki benzerliklere bağlı olarak, aile üyeleri yapısal homoloji sergilerler ve birbirinden bağımsız zıt biyolojik işlevlerin yerine getirilmesi için benzer reseptörlere (sinyal yollarına) sahiptirler (Belladonna ve Grohmann, 2013). Bu sitokin ailesi, çeşitli fenotipik özellikler üretmek için çoklu işlevler sunar. Egwuagu ve ark., konak immünitesinin şekillenmesi ve düzenlenmesinde bu sitokinlerin önemli fonksiyonları olduğunu göstermiştir. Bu sitokinler, Th1, Th2 ve Th17 tipi yanıtlarla enflamasyonun desteklenmesinden Treg hücre proliferasyonu aracılı anti-enflamatuvar savunmaya

kadar birçok immün yanıt çeşidini düzenler (Egwuaguve ark., 2015). Oluşan yeni heterodimer (Ebi3/p35) formunun, daha sonra güçlü immün düzenlemede yer aldığı keşfedilmiştir (Collison ve ark., 2007; Devergne ve ark., 1996). IL-35'in alfa ve beta alt-birimleri, büyük ölçüde, aktive edilmiş dendritik hücre, B-hücre, monosit ve makrofajların antijen sunan hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen, düzenleyici Foxp3⁺ Treg hücrelerden türetilmiştir. T hücreleri tarafından interferon- γ (IFN- γ) oluşumunu destekleyerek Th1 yanıtlarını da yönlendirebilirler (Collison ve ark., 2007; Song ve Ma, 2016).

IL-35'in gen ekspresyon progresyonunu içeren Live ver ark., tarafından yapılan bir çalışma, daha önce gösterilenlere kıyasla (Treg'ler ile ilişkili olarak) doku dışı dağılımını ortaya çıkarmıştır (Live ark., 2012). p19/p40 (vizil-23) ile birlikte p35/p40 heterodimeri (IL-12), bu sitokin ailesinin temel üyelerini oluşturur. IL-27, IL-12 benzeri Th1 yanıtlarını sürdürmek ve IL-10 bağımlı immünoşüpresyonu endüklemek gibi (Aparicio-Siegmund ve Gerbers, 2015; Hasegawa ve ark., 2016; Villarino ve ark., 2004) pleomorfik olayları gerçekleştirme yeteneğindedir. IL-35, IL-10, TGF- β ve IL-12 sitokin ailesi üyesi olan IL-27'den oluşan süpresif sitokinler sınıfına göre yeni bir yaklaşımı temsil etmektedir (Sawant ve ark., 2015). Bu baskılayıcı sitokinler, bağışıklık sisteminin işleyişi için gerekli olan kritik immünomodülatör ağlar ve toleransı destekleyen kanallardan oluşurlar (Sawant ve ark., 2015). Collison ve ark., IL-35'i, T efektör (Teff) hücre genişlemesini ortadan kaldırma kapasitesine sahip iken, aynı zamanda naif T hücrelerinin, IL-35 aracılığıyla özel olarak çalışan endüklenmiş Treg hücrelerin güçlü bir popülasyonuna (iT_r) dönüşmesine aracılık eden, tamamen immünoşüpresif bir sitokin olarak tanımlamıştır (Collison ve ark., 2007).

Uyarılmamış fare Treg'leri, IL-35'i salgılayabilmeleri için uygun donanıma sahip iken, uyarılmamış insan Treg'leri bunu yapma yeteneğine sahip değildir (Collison ve ark., 2007). Bu, IL-35'in endüklenebilir olduğunu ve insanlar tarafından temel olarak ifade edilmediğini göstermektedir. Li ve ark. tarafından yapılan çalışmada, monositler, düz kas hücreleri ve endotelial hücrelerde IL-35 mRNA'nın varlığını gösteren bulgular elde edilmiştir (Li ve ark., 2012). Birlikte ele alındığında, bu veriler IL-35'in rolünü, enflamatuvar uyaranlara tepki olarak salgılanan duyarlı bir sitokin olarak tanımlamaktadır (Li ve ark., 2012). Ancak, Mao ve ark. IL-35'in insan plasental trofoblast hücrelerinde intrinsik olarak ifade edildiğini ortaya koymuştur (Mao ve ark.,

2013). Özellikle, endotelyal hücreler, aktive B hücreleri, dendritik hücreler, monositler, düz kas hücreleri ve makrofajların IL-35 salgıladığı bildirilmiştir (Choi ve ark., 2015; Sha ve ark., 2015).

IFN- γ 'ye yanıt olarak salgılanan IL-35, TLR3 ve TLR4 üzerinde bir agonist görevi görür. IL-35'in immünomodülatör fonksiyonu, temel olarak, Treg hücre proliferasyonu ve IL-10 üretiminin artması ile birlikte CD4⁺ efektör hücre genişlemesinin (Th1 ve Th17 dahil) inhibisyonu ile gerçekleşir (Choi ve ark., 2015).

IL-35, Treg hücre popülasyonunu genişleterek, Teff hücrelerini etkili bir şekilde inhibe eder. Kronik bir enfeksiyonun meydana gelmesi durumunda ise immün hasarı azaltmak için Th17 hücre farklılaşmasını destekler (Choi ve ark., 2015). Anti-enflamatuvar bir yanıtın başlatıcısı ve efektörü olarak tanımlanmasına rağmen, canlı sistemlerde IL-35'in ana etkileri henüz açık bir şekilde aydınlatılamamıştır (Xinyuan ve ark., 2017).

2.13.4.2. İnterlökin 37 (IL-37)

IL-1 ailesinin yeni tanımlanan üyelerinden IL-37, hem doğal hem de edinsel immüneyi etkileyen anti-enflamatuvar sistemin önemli bir parçası olarak ortaya çıkmıştır. Beş transkript varyantı bulunmakla birlikte (IL-37a–e), altı ekzondan beşini içeren en büyük varyant IL-37b olarak tanımlanmıştır (Busfield ve ark., 2000; Smith ve ark., 2000; Taylor ve ark., 2002).

İnterlökin-1 (IL-1) ailesinin, aşırı enflamasyonu önlemek için sıkı bir şekilde düzenlenmiş pro-enflamatuvar üyelerden oluştuğu bilinmektedir. IL-1 reseptör antagonistinin IL-1 α ve IL-1 β 'yi baskılaması (Arend, 2002), IL-18 bağlayıcı proteinlerin IL-18'i nötralize edebilmesi (Novick ve ark., 1999) ve IL-36 reseptör antagonistlerinin IL-36 aktivitesini azaltması (Towne ve ark., 2011) buna örnek olarak gösterilmektedir. Ayrıca anti-enflamatuvar özellikteki IL-37, IL-1 ailesinin diğer üyelerinin işlevlerini ve TLR reseptör agonistleri tarafından sağlanan pro-enflamatuvar sinyalleri de geniş ölçüde baskılamaktadır (Dinarello ve Bufler, 2013).

IL-1 α ve IL-33'e benzer şekilde, IL-37'nin hem hücre dışı hem de hücre içinde aktif olduğu gösterilmiştir. Hücre içinde çekirdeğe geçerek TLR-agonisti endüklü

sitokinleri, kaspaz-1 bağımlı mekanizma ile süprese etmektedir (Bulau ve ark., 2014; Sharma ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalar melanoma, SLE, kolit, romatoid artrit, atopik dermatit ve morbid obezite hastalarında daha yüksek IL-37 ekspresyonu olduğunu bildirmiştir (Fujita ve ark., 2012; Luo ve ark., 2013; McNamee ve ark., 2011; Moschen ve ark., 2011; Nold ve ark., 2010; Song ve ark., 2012). Başka bir çalışmada, IL-37'nin hem artmış hem de azalmış miktarları ile hastalığın şiddeti arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (Dinarello ve Bufler, 2013).

Deneyisel araştırmalarda, IL-37'nin dendritik hücre olgunlaşmasının engellenmesiyle edinilmiş immüitenin baskılanmasına aracılık ettiği, böylece doğal ve edinsel bağışıklık arasındaki fonksiyonel bağlantıyı da etkilediği raporlanmıştır (Luo ve ark., 2013; Nold ve ark., 2010). IL-37'nin anti-enflamatuvar ve immünosüpresif fonksiyonları, bu sitokinin gelecekte aşırı enflamasyonun hakim olduğu hastalıklarda terapötik bir uygulama olarak kullanılabilmesi ile ilgili öngörülerini arttırmaktadır.

2.13.4.3. İnterlökin 38 (IL-38)

IL-1 ailesi (IL-1F) ile ilgili güncel bilgi 11 üyeye kadar genişlediği yönündedir (IL-1F1-IL-1F11). Bu sitokinler sırasıyla; IL-1 α , IL-1 β , IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra), IL-18, IL-36Ra, IL-36 α , IL-37, IL-36 β , IL-36 γ , IL-38 ve IL-33'tür (Dinarello ve ark., 2010). Bu protein molekülleri invazif patojenik mikroorganizmalara ve fiziksel hasara karşı ilk savunma hattını oluşturarak enflamasyon ve immün yanıtlarda oldukça önemli rol oynar.

IL-38, 2001 yılında DNA bazlı çalışmalar sonucu bulunan IL-1F'nin yeni üyelerindedir (Bensen ve ark., 2001; Lin ve ark., 2001). IL-38, IL-1F'nin onuncu üyesidir ve reseptörü IL-1 reseptör ilişkili protein 2 (IL-1Rrp, IL-36R)'dir. IL-38, bir IL-36 antagonistidir ve fonksiyonları IL-1Ra ve IL-36Ra gibi tipik reseptör antagonistlerine benzer (van der Veerdonk ve ark., 2012). IL-38, agonist reseptör ligandlarının IL-36R'ye bağlanmasını engelleyerek enflamasyonu azaltır.

Yapılan çalışmalarda, IL-38 mRNA, kalp, plasenta, fetal karaciğer, deri, dalak, timus ve tonsillerdeki dokularda ölçülmüştür. IL-38, daha çok deride ve tonsillerin

prolifere B hücrelerinde eksprese edilmektedir (Lin ve ark., 2001). Ayrıca non-immün dokularda (kalp ve plasenta gibi) diğer IL-1F üyelerine benzer şekilde düşük seviyelerde bulunur.

Bazı IL-1F üyeleri sürekli üretilirken, diğerleri bakteri veya enflamatuvar mediatörler aracılığıyla hızlıca endüklenecek şekilde eksprese olur (Busfield ve ark., 2000; Smith ve ark., 2000). En son çalışmalar, IL-1 ailesi üyelerinin geniş oranda enflamatuvar hücrelerde eksprese olduğu yönündedir. Bu sitokinler, hücre yüzey reseptörü IL-1R ile eşleşir ve nükleer tanskriptleri (NF- κ B, AP-1 gibi) de içine alan sinyal yollarını endükler. Ayrıca, bu sinyalizasyon molekülleri, siklooksijenaz, nitrik oksit sentaz ve enflamasyon gelişimini destekleyen diğer mediatörlerin ekspresyonunu endükler. IL-38'in biyolojik fonksiyonu, IL-36 sitokininin (IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ) IL-36R'ne bağlanmasını inhibe etmektedir. Bir reseptör antagonisti olarak aktivitesi anti-enflamatuvar etki gösterir. IL-38 ekspresyonu ile ilgili güncel bilgiler olmasına karşın tam olarak anlaşılammıştır ve daha çok araştırmaya gerek duyulmaktadır.

2.14. İnterferonlar

İnterferonlar endüklenebilen ve çok sayıda gen tarafından kontrol edilebilen sitokinlerdir. Genel olarak iki grupta incelenir. Tip I interferonlar; viral interferonlar olarak da adlandırılır. IFN- α , IFN- β ve IFN- ω 'dan oluşur (Abbas ve Lichtman, 2007; Kılıçturgay, 2003). İmmün interferon olarak da adlandırılan tip II interferon ise IFN- γ 'dır. Tip I interferonlar virüs enfeksiyonu ile endüklenirken, tip II interferonlar mitojenik veya antijenik uyarı ile salınır.

Bruselloz benzeri bakteriyel enfeksiyonlarda IFN- γ , CD4⁺ T lenfositler, CD8⁺ T lenfositler ve NK hücrelerden sentezlenir (Feldman, 1993; Abbas ve Lichtman, 2007). İnterferonlar hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanarak etki eder. IFN- γ , IFN- γ reseptörü (IFNGR)'ne bağlanarak etki eder. Bu reseptörde IFNGR I ve IFNGR II olmak üzere iki alt birimden oluşur. İnterferonlar reseptörlere bağlandıktan sonra reseptörde dimerizasyon meydana gelir. Bu dimerizasyon hücre içerisindeki bir dizi kinazı aktive ederek interferon yanıtını oluşturur (Abbas ve Lichtman, 2007; Feldman, 1993; Kılıçturgay, 2003).

IFN- γ makrofajların güçlü bir aktivatörüdür. Ayrıca mikroorganizmaların fagositozunu uyaran antikor izotiplerinin üretimini de uyarır. IFN- γ antijen sunan hücreler üzerinde MHC sınıf II moleküllerinin ve B7 yardımcı uyarınlının ekspresyonunu artırır. Ayrıca, hücrel proliferasyonu inhibe eder, apoptozu endükler, mikrobisidal efektör işlevleri aktive eder, immünomodülasyonu ve lökosit işlevini düzenler (Densen, 2000; Feldman, 1993).

IFN- γ üretimi ASH'lerden salınan sitokinlerce kontrol edilir. Makrofajların salgıladığı IL-12 ve kemokinler (örneğin, MIP-1 α) NK hücrelerini enflamasyon odağına çeker. IL-12, NK hücrelerde IFN- γ üretimini artırır.

Makrofajlar, NK hücreleri ve T hücrelerde IL-12 ve IL-18 sitokin kombinasyonu IFN- γ üretimini daha da artırırken, IL-4, IL-10, TGF- β ve glukokortikoidler IFN- γ üretimini baskılar. IFN- γ , Th1 hücrelerinin en önemli ürünüdür ve immün yanıtı Th1 fenotipine doğru kaydırır. IFN- γ ile endüklenen özgül sitotoksik immünite çeşitli mekanizmalarla gelişir. Bu mekanizmalar arasında Th2 hücre popülasyonunun inhibisyonu, antijen işlenmesinin ve sunumunun artırılması ve ASH'lerde eş uyarıcı moleküllerin artışı sayılabilir (Feldman,1993). IFN- γ makrofajlarda reaktif oksijen ara ürünlerini ve nitrik oksitin yapımını artırarak mikrobisidal aktiviteyi uyarır. IFN- γ eksik fareler, hücre içi patojen kaynaklı enfeksiyonlara yatkınlık gösterir (Densen, 2000). IFN- γ ve IL-12/ β 2 mikroglobülin nakavt farelerden elde edilen güncel veriler IFN- γ 'nın bruselloz kontrolünde STL'lerden daha önemli olduğunu göstermektedir (Brandão ve ark., 2012). Murphy ve ark., IFN- γ eksik BALB/c farelerde yaptıkları bruselloz çalışmasında, hücrelerin Brucella enfeksiyonunu kontrol etme yeteneğinde azalma gözlenirken, normal BALB/c farelerde bir süre sonra enfeksiyonun temizlendiği görülmüştür.

2.15. Kemokinler

Kemokinler 8-12 KDa molekül ağırlığına sahip, çoklu bölgeleri bulunan protein yapısındaki moleküllerdir. Günümüzde elliden fazla kemokin molekülü ve yirmiden fazla kemokin reseptörü tanımlanmıştır (Wuyts ve ark., 1998). Kemokinler, enflamasyon ve homeostaz sağlanması aşamasında hücrel hareketleri düzenler. Enflamatuvar süreçte kemokinlerin sentez ve salınımındaki belirgin artış, lökositlerin

enflamasyonlu dokuya geçişlerinde önemli rol oynamaktadır. IL-1, LPS, TNF- α , IFN- γ ve IL-4 bilinen en önemli kemokin uyarıcılarıdır (Wuyts ve ark., 1998).

Aminoasit zincirindeki sistein kalıntıları temel alınarak CC kemokinler, CXC kemokinler, C kemokinler, CX3C kemokinler şeklinde sınıflandırılırlar. Hücre yüzeyinde transmembranik G proteinlerine bağlı reseptörlere bağlanarak etki gösterirler. Farklı kemokinler birden fazla reseptöre bağlanabilir. Kemokinler, Th1, Th2 farklılaşmasında, lenfoid organ gelişiminde, yara iyileşmesinde, lökosit trafiğinde, enflamasyonda, anjiyogenezde ve metastaz süreçlerinde rol oynar (Abbas ve Lichtman, 2007, Wuyts ve ark., 1998). Brusellozdaki kemokinlerin etkinliği üzerinde yapılan çalışmalar sonucu, enfeksiyon süresince aktivite gösteren farklı kemokin grupları saptanmıştır.

IL-8, monositler, makrofajlar, fibroblastlar, keratinositler, hepatositler, epitelyal ve endotel hücrelerde üretilen bir kemokindir. Nötrofiller, T hücreler ve monositlerin, enflamasyon alanına göçünü düzenlemede oldukça etkin rolü vardır. Bruselloz patogeneğinde IL-8 düzeyinde artış kaydedilmiştir. Delpino ve ark., *Brucella* ile enfekte hepatositlerde IL-8 salınarak immün yanıtların tetiklendiğini göstermiştir. Ayrıca, *Brucella*'nın hücre içi yaşamının relaps mekanizmalarında önemli olduğunu ve immün aktivasyon gerçekleşmeden önce yüksek IL-8 seviyeleri ile relapsın tahmin edilebileceğini öne sürmüşlerdir (Delpino ve ark., 2010).

MCP-1, brusellozda en önemli ikinci kemokin grubudur. Monosit ve makrofajlar tarafından sentezlenir ve bu hücreler üzerinde etki gösterir. Bruselloz, öncelikli olarak monositler tarafından MCP-1'in üretimini endükler. MCP-1 eksik olan farelerde granuloma oluşumunun inhibe edildiği gösterilmiştir. MyD88 nakavt farelerle yapılan çalışmada, makrofajların MCP-1'i düşük seviyede ürettiği gözlenmiştir.

RANTES, brusellozda rol oynayan, lenfosit, makrofaj, fibroblast, trombosit, düz kas, endotel ve epitel hücreleri tarafından üretilen, CCR1, CCR3, CCR4 ve CCR5 gibi birçok kemokin reseptörüne bağlanabilen bir kemokindir. Fare modelleri ile yapılan çalışmalarda bu enflamatuvar kemokinin ekspresyon düzeylerinin düşük seviyede kaldığı gözlenmiştir.

Bu kemokinlerin dışında brusellozda hücre trafiğini düzenleyen MIP-1 α , MIP-2, MCP-3, MCP-5 kemokinleri de bulunmaktadır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmalara Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alındıktan sonra başlandı (Karar no: 2017-3/22). Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kliniğine başvuran 40 akut (27 erkek, 13 kadın) ve 40 kronik (28 erkek, 12 kadın) bruselloz hastası ile herhangi bir hastalığı olmayan 40 sağlıklı (28 erkek, 12 kadın) birey çalışmaya dahil edildi. Tüm hastalara çalışma hakkında bilgi verilerek onayı alınan hastalar çalışmaya katıldı. Hastalar akut (0-2 ay) ve kronik (>12 ay) semptomların oluşma süresine göre sınıflandırıldı. Ateş, terleme, yorgunluk semptomlarının yanısıra standart tüp aglütinasyon titresinin >160 olması gibi bir ya da birden fazla belirtinin varlığı ile bruselloz tanısı konuldu. Ayrıca akut ve kronik hastalar kemik eklem tutulumu (osteoartiküler) olan (akut:11; kronik:15) ve olmayan (akut:29; kronik:25) olarak iki gruba ayrılarak incelendi. Akut ve kronik bruselloz tanısı almış hastalar ve sağlıklı gönüllülerin periferik kanlarında immünomodülatör sitokin düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak saptandı. Hastalardan ve sağlıklı gönüllülerden sitokin ölçümü için 10 ml periferik kan kuru tüplere alındı ve santrifüjlenip serumları ependorflara aktarılarak çalışılacağı tarihe kadar -80°C'de muhafaza edildi. Tüm sitokinler için benzer ELISA prosedürü kullanıldı. PCR çalışması için heparinli tüplere alınan kanlardan (10 ml) ise fikol dansite gradient yöntemi ile PKMH'ler toplanarak -80 °C'de saklanmıştır.

3.1. Periferik Kanda Sitokin Düzeylerinin Saptanması

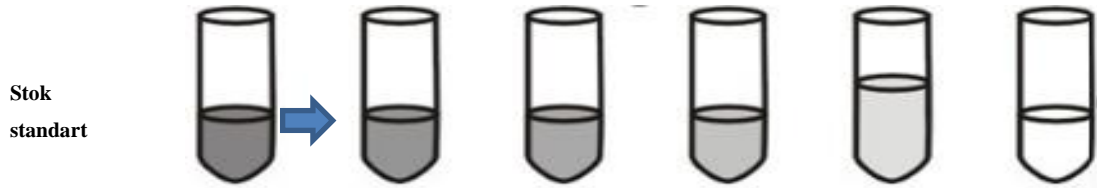
Çalışmada kullanılan kantitatif sandiviç ELISA yöntemi basamakları prosedüre uygun şekilde yapıldı.

- Tüm reaktifler önce oda sıcaklığına getirildi.

- Her bir sitokinin çalışma prosedürüne göre standartlar dilüe edildi (Tablo3, Şekil 7).

Tablo 3. Standart Dilüsyonlar

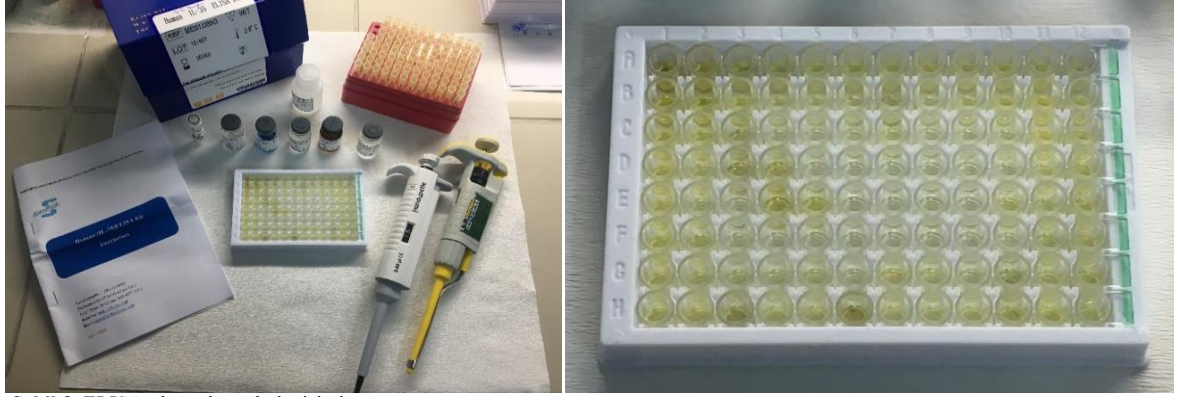
8ng/L	Standart No.5	120µl Orjinal Standart + 120µl Standart Dilüent
4ng/L	Standart No.4	120µl Standart No.5 + 120µl Standart Dilüent
2ng/L	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart Dilüent
1ng/L	Standart No.2	120µl Standart No.3 + 120µl Standart Dilüent
0.5ng/L	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart Dilüent



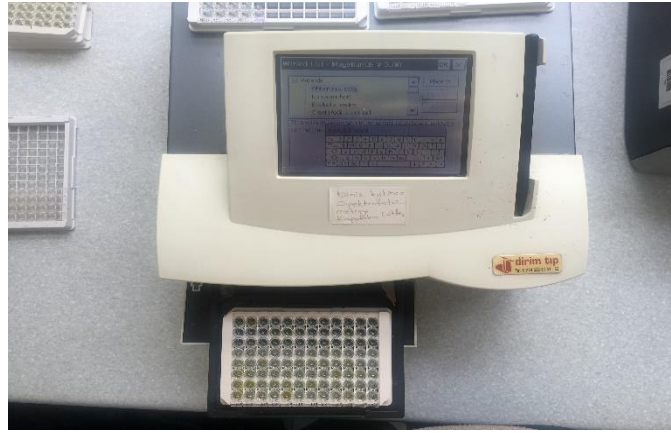
Tüp	Standard	S5	S4	S3	S2	S1
L	16	8	4	2	1	0.5

Şekil 7. Standartların elde edilmesi

- Boş kuyucuklara sadece kromojen solüsyon A ve B ile stop solüsyonu eklendi.
- Standart solüsyon kuyucuklarına 50'şer µl standart ve 50'şer µl *streptavidin-HRP* eklendi.
- Örnek kuyucuklarına 40'ar µl serum örneklerinden, 10'ar µl sitokin antikorlarından ve 50'şer µl *streptavidin-HRP* konuldu.
- Seal plate membrane* ile kapatılarak hafifçe çalkalandı ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
- Yıkama solüsyonu 30x sulandırılma göre distile su ve *washing buffer* ile hazırlandı.
- İnkübasyon sonrası kuyucukların içi dökülerek yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
- Her bir kuyucuğa önce 50'şer µl kromojen A solüsyonu ve ardından kromojen B solüsyonu eklenerek 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Sonrasında her kuyucuğa 50'şer µl stop solüsyonu eklenerek renk değişimi gözlemlendi.
- Renk değişimi gözlemlendikten sonra ELISA okuma cihazında (Tecan, Austria) 450 nm'de okutuldu.



Şekil 8. ELISA plağında renk değişimi



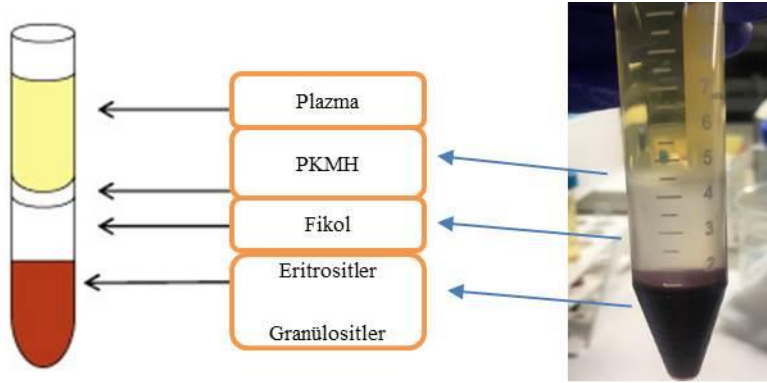
Şekil 9. ELISA plağının spektrofotometrede okutulması

Ticari amaçla satılan Human ELISA kitlerinde (IL-35, IL-37, IL-38 (SunRed Bio, Shanghai, China); IL-36, IL-39 (YLBiont, Shanghai, China)) belirtilen prosedür takip edilerek serum örneklerinde sitokin düzeyi ölçümü yapıldı. Ölçüm sonunda kitlerin içerisinde bulunan konsantrasyonları bilinen sitokin standartlarının vermiş olduğu optik dansite değerleri ile konsantrasyon değerleri kullanılarak standart grafikleri çizildi. Örneklerimizdeki sitokinlerin konsantrasyonu standart grafikler kullanılarak Excel programında (Microsoft, US) analiz edildi. Her bir sitokin için kullanılan kitlerin ölçüm duyarlılığı sırasıyla; IL-35: 4.114ng/L; IL-36: 0.026 ng/L; IL-37: 0.513pg/ml; IL-38: 0.722 ng/L ve IL-39: 0.13 pg/ml olarak verilmiştir.

3.2. PKMH'de Sitokinlerin Gen Ekspresyon Düzeylerinin Saptanması

3.2.1. PKMH İzolasyonu

Kantitatif *real time* PCR (RT-PCR) yöntemi ile çalışıldı. PKMH eldesi için hastalardan ve sağlıklı gönüllülerden heparinli tüplere 10 mL kan alındı. Aynı gün içerisinde ficol ile dansite gradient yöntemi kullanılarak periferik kandan PKMH hücre izolasyonu yapıldı. Heparinli tüplerdeki kanlar PBS ile sulandırılıp fikole (1.077 g/ml) yayıldı. Önce x 2500g'de 20 dakika santrifüj edilerek mononükleer hücreler toplandı ve tekrar x 1500g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üzerinden süpernatant atılarak mikroskopta hücre sayımı yapıldı ve depolama sürecinde RNA degradasyonunu önleme amacıyla üzerine *TriPure Isolation Reagent* (Roche) eklenerek daha sonra RNA ve cDNA izolasyonu yapılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.



Şekil.10. Fikol dansite gradient santrifüj yöntemi ile PKMH eldesi

3.2.2. RNA İzolasyonu

-PKMH'ler hücreler fikol ile dansite gradient yöntemi ile ayrıldıktan sonra *RNAeasy®Mini Kit* (Qiagen, Germany) ile RNA izolasyonu yapılmıştır. Kitin prosedürüne uygun olarak önce hücreler lize ve homojenize edilmiştir. Ardından RNA etanol ile spin kolon membrana sabitlenip yıkamalar yapılarak saf halde tüplere toplanmıştır. İzolasyonun basamakları şu şekildedir:

- Hasta ve sağlıklı kontrollerden elde edilen örneklerin hücre sayıları kitin prosedürüne uygun olarak 5 ile 10 milyon arasında olacak şekilde ayarlandı.

- Daha sonra her birinin (pellet) üzerine hücrelerin lize edilmesi için *Buffer RLT* solüsyonu eklendi (Tablo 4).

Tablo 4. Hücre sayısına göre Buffer RLT hacmi

Hücre sayısı	<i>Buffer RLT</i> hacmi (μ l)
$< 5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600

-Lizat direkt olarak 2 ml’lik tüplerdeki spin kolonlara pipetlendi ve 2 dakika santrifüj edildi.

-Spin kolonlar üzerine RNA’nın fikse olması için 1 hacim %70’lik etanol eklenerek pipetajla karıştırıldı.

-Örneklerden 700 μ l kadar *RNAeasy* spin kolon tüplere aktarıldı ve $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm)’de 15 saniye santrifüj edildi. Süpernatantlar döküldü.

-Spin kolonlara 700’er μ l *Buffer RW1* eklenerek tekrar $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm)’de 15 saniye santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı.

-Üzerlerine 500’er μ l *Buffer RPE* eklendi. Tüpler $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm)’de 15 saniye edildi. Süpernatant atıldı.

-Tekrar 500’er μ l *Buffer RPE* eklenerek $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm)’de 2 dakika santrifüj edildi.

-*RNA easy* spin kolonu yeni bir tüpe yerleştirilip 1 dakika santrifüj edildi.

-30-50 μ l *RNAase-free water* spin kolon membranına ekleyerek $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm)’de 1 dakika santrifüj edildi ve spin kolonları atılarak RNA’lar tüplerde toplandı.

3.2.3. cDNA İzolasyonu

RT-PCR öncesi cDNA sentezi için uygulanan işlem basamakları şu şekildedir:

-Elde edilen RNA’lardan cDNA’ları ayırt edebilmek için *RT² First Strand Kit* (50) (Qiagen, Germany) kullanıldı.

-Çalışmaya başlamadan önce *RT² First Strand Kit reagentları* 10-15 saniye santrifüjlendi.

-Her bir RNA örneğine genomik DNA eliminasyon karışımı tablodaki oranlarda hazırlanarak pipetaj yapıldı ve ardından iyice santrifüjlendi (Tablo 5).

Tablo 5. DNA eliminasyon miksi

İçerik	Miktar
RNA	25 ng-5 µg
<i>Buffer GE</i>	2 µl
<i>Nuclease-Free Water</i>	Değişebilir
Toplam Hacim	10 µl

-Genomik DNA eliminasyon karışımı 5 dakika 42°C’de inkübe edildi hemen ardından 1 dakika buzda bekletildi.

-Revers-transkripsiyon karışımı tablodaki oranlarda hazırlandı (Tablo 6).

Tablo 6. Revers-transkripsiyon miksi

İçerik	1 reaksiyonluk hacim
<i>5X Buffer BC3</i>	4 µl
<i>Control P2</i>	1 µl
<i>RE3 Reverse Transcriptase Mix</i>	2 µl
<i>Nuclease-Free Water</i>	3 µl
Toplam Hacim	10 µl

-Her bir tüpteki 10’ar µl genomik DNA eliminasyon karışımına 10 µl revers-transkripsiyon karışımı eklenerek pipetaj yapıldı.

-*Thermal cycler* cihazında (Corbett, Australia) önce 42°C’de 15 dakika, ardından 95°C’de 5 dakika ve 4°C’de 60 dakika inkübe edildi.

-Cihazdan alınan kuyucuklardaki her bir reaksiyon için 91 µl *RNase-free water* eklenerek pipetaj yapıldı.

-Reaksiyonlar buz üzerine alınarak RT-PCR protokolüne uygun halde bekletildi.

-Son olarak *Nanodrop* cihazı (MAESTROGEN, Taiwan) kullanılarak RNA ve cDNA ölçümleri yapıldı. Ölçüm değerleri aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir (Tablo7,8).

Tablo 7. RNA A260/280 ve konsantrasyon değerleri

RNA					
A260/280			Konsantrasyon		
Kontrol Grubu	Kronik Grup	Akut Grup	Kontrol Grubu	Kronik Grup	Akut Grup
2	2,2	2,3	98	93	180
2,4	2,2	2,3	136	124	180
2,3	2,3	2,3	94	223	52
2,2	2,2	2,3	175	110	85
2,3	2,3	2,3	126	82	122
2,2	2,3	2,2	158	95	64
2,2	2,4	2,3	230	97	108
2,3	2,2	2,2	116	109	160
2,1	2,2	2,2	217	60	245
2,2		2,3	190		216
		2,2			103

Tablo 8. cDNA A260/280 ve Konsantrasyon Değerleri

cDNA					
A260/280			Konsantrasyon		
Kontrol Grubu	Kronik Grup	Akut Grup	Kontrol Grubu	Kronik Grup	Akut Grup
2,043	2,184	2,043	213	205	216
2,058	2,165	2,091	217	217	212
2,150	2,167	2,086	209	211	250
2,101	1,999	2,053	213	224	234
1,963	2,214	2,091	224	205	212
2,068	2,047	2,116	213	217	203
2,053	2,063	2,112	212	215	207
2,059	2,063	2,068	213	217	215
2,152	2,125	2,120	248	209	211
2,133		2,060	207		216
		1,989			213

3.2.4. RT-PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyonlarının Tayini

-Çalışmaya başlamadan önce kullanılacak olan *RT² SYBR Green Mastermix*, *RT² qPCR Primer Assay* ve *cDNA synthesis reaction reagent* oda sıcaklığına getirilerek 10-15s santrifüjlendi.

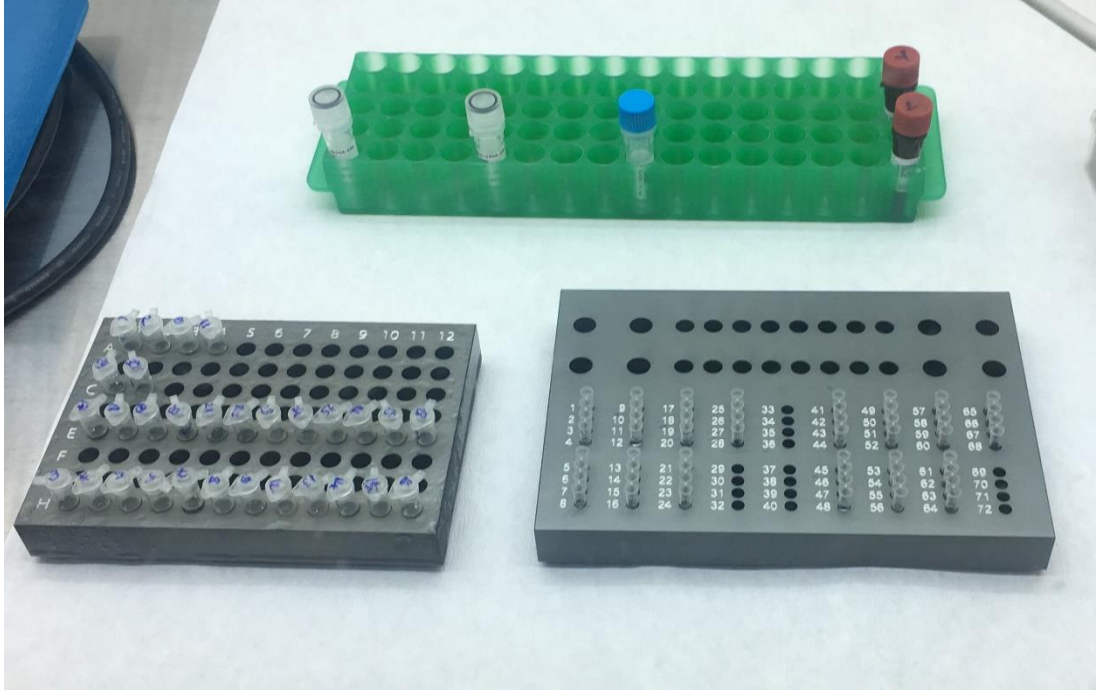
-PCR komponentleri 5ml'lik tüplerde hazırlandı (Tablo 9 ve 10).

Tablo 9. PCR Komponent İçeriği

Komponent	Hacim
<i>RT² SYBR Green Mastermix</i>	12,5 µl
<i>cDNA synthesis reaction</i>	1 µl
<i>RT² qPCR Primer Assay</i> (10 µM stok)	1 µl
<i>RNase-free water</i>	10,5 µl
Toplam Hacim	25 µl

Tablo 10. Kullanılan Primer Assay'ler ve İlgili Sitokinler

Kullanılan RT² qPCR Primer Assay'ler	İlgili Sitokinler
<i>Actin beta (ACTB)</i>	<i>Housekeeping gen</i>
<i>Interleukin 12A (p35)</i>	IL-35
<i>Ebi3 (Epstein-Barr virus induced 3)</i>	IL-35, IL-39
<i>Interleukin 36 gamma (IL-36G)</i>	IL-36
<i>Interleukin 37</i>	IL-37
<i>Interleukin 1 Family member 10 (theta) (ILF10)</i>	IL-38
<i>Interleukin 23 alpha subunit p19 (IL23A)</i>	IL-39



Şekil 11. PCR komponentlerinin hazırlanması

-Daha sonra *Rotor Disc*'in boş tüplerine hazırlanan mikşlerden 20'şer µl eklendi.
-*Rotor Disc 100* yükleme bloğuna A1 pozisyonundan başlayacak şekilde tüpler yerleştirildi ve *Rotor Gene* kapağı sıkıca kapatılarak program tablodaki şekilde başlatıldı.



Şekil 12. *Rotor Disc*'in cihaza yerleştirilmesi

Tablo 11. *Rotor Gene Q Cycle* Süreci

Cycle	Süre	Sıcaklık	Yorum
1	10 dk	95°C	<i>Hot Start DNA Polymerase</i> bu sıcaklık basamağında aktive olur.
40	15 s 30 s	95 °C 60 °C	Floresans verinin toplandığı basamak

-*Rotor Gene Q*'daki *cycle* süreçleri bittikten sonra her bir tüp için *threshold cycle* (C_T) değerleri *real-time cycler software* üzerinden elde edildi. *RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5* ([https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/other-real-time-pcr-probes-or-primers-data-analysis center/](https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/other-real-time-pcr-probes-or-primers-data-analysis-center/)) kullanılarak tüm sitokinlerdeki her bir mRNA' nın Kat Değişimi (*Fold Change*) belirlenmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için IBM SPSS İstatistik 20 (Chicago, IL, ABD) paket programı kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmeler için ki-kare testi ve takiben *Kruskall-Wallis* testi kullanıldı. İkili karşılaştırmalar için *Mann-Whitney* testi uygulandı. Elde edilen veriler ortalama \pm standart hata şeklinde belirtildi; 0,05'den küçük p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya 40 akut, 40 kronik brusellozlu hasta ve 40 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Hastaların cinsiyetleri ve yaş ortalamaları Tablo 12’de gösterilmiştir. Akut ve kronik hasta gruplarında kemik eklem (KE) tutulumu olan ve olmayan bireylerin sayısı ise tablo 13’te gösterilmiştir.

Tablo 12. Akut, Kronik ve Sağlıklı Gruplarında Cinsiyet ve Yaş Dağılımı

	Sağlıklı Kontrol (n)	Akut Hasta (n)	Kronik Hasta (n)
Erkek	28	27	28
Kadın	12	13	12
Yaş Ortalaması	48,9 ± 15,4	43,8 ± 13,2	44,8 ± 11,2

Tablo13. Akut ve kronik gruplarında KE tutulumu olan ve olmayan hastalar

	Akut (n)	Kronik (n)
KE tutulumu (+)	11	15
KE tutulumu (-)	29	25
Toplam (n)	40	40

KE: kemik eklem

4.1. Ekstrasellüler Sitokin Düzeyleri

Sağlıklı kontroller ve hasta gruplarının sitokin seviyelerinin sayısal değerleri ve her hasta için aşağıdaki tablolarda ayrı olarak gösterilmiştir. Çalışmada IL-39 için kullanılan kitlerin ekonomik sebeplerle tamamının alınamaması (2 kutu yerine 1 kutu alınması) nedeniyle var olan kontrol ve hastalardan uygun sayıda seçilerek çalışmaya dahil edilmiştir. IL-39 sitokini için sonuçlar ayrı tabloda verilmiştir.

Tablo 13. Sağlıklı Kontrol Grubunun IL-35, IL-36, IL-37, IL-38 Sitokin Düzeyleri

No	İsim	IL-35 (ng/ml)	IL-36 (ng/ml)	IL-37 (pg/ml)	IL-38 (ng/ml)
1	H.C.	1463,9	3,01	191,1	184,9
2	B.K.	308,9	1,00	41,5	42,0
3	F.D.	1826,8	3,40	240,6	241,1
4	D.G.	1986,1	3,56	313,2	263,7
5	F.D.	216,8	1,16	48,8	43,8
6	E.K.	902,5	2,40	121,4	117,3
7	M.K.	277,5	0,87	39,0	46,7
8	S.K.	1757,5	3,21	249,9	236,1
9	Ö.K.	1292,5	3,10	166,9	167,4
10	T.S.	353,9	1,84	55,5	50,9
11	E.B.	652,5	1,88	101,3	109,4
12	M.A.K.	1801,8	3,58	289,4	230,8
13	E.A.	1891,8	3,28	289,3	247,3
14	Z.K.	433,2	1,30	72,4	67,1
15	O.A.	478,9	1,43	80,4	86,2
16	C.Y.	291,8	0,83	49,3	49,6
17	R.T.	461,8	1,47	39,0	41,3
18	H.A.	329,6	1,12	64,2	52,4
19	R.A.	217,5	0,70	41,4	42,4
20	R.C.	420,4	0,95	41,6	43,8
21	H.B.O.	1118,9	2,73	165,8	169,1
22	İ.A.	251,8	0,88	38,7	42,1
23	F.A.	329,6	0,92	48,0	55,1
24	Ş.B.	513,2	1,82	82,1	81,6
25	M.K.	267,5	1,36	43,0	53,3
26	H.D.	901,1	2,41	114,3	132,4
27	M.Ö.	208,9	1,01	34,5	47,6
28	M.K.	357,5	1,23	48,4	56,4
29	H.D.	231,1	1,03	38,0	47,5
30	A.K.	255,4	0,86	37,1	41,8
31	E.T.	354,6	0,86	51,0	47,2
32	Ö.A.	2060,4	3,78	318,7	270,3
33	Z.A.	303,9	1,07	38,3	45,7
34	N.D.	1789,6	3,18	218,8	230,2
35	Y.Y.	789,6	2,42	114,0	128,6
36	D.G.K	196,8	1,01	30,3	36,9
37	E.A.	267,5	0,94	49,2	47,2
38	Ö.U.	246,1	0,91	36,1	43,9
39	Z.A.	281,1	0,98	44,6	51,5
40	A.R.G.	371,1	1,44	63,5	72,4

Tablo 14. Akut Bruselloz Hasta Grubunda IL-35, IL-36, IL-37, IL-38 Sitokin Düzeyleri

No	İsim	IL-35 ng/ml	IL-36 ng/ml	IL-37 pg/ml	IL-38 ng/ml
1	K.P.	236,1	1,36	40,8	32,5
2	S.E.	206,1	0,97	18,7	39,9
3	S.B.	253,2	1,20	37,8	50,0
4	M.K.	41,8	0,07	8,0	12,9
5	U.E.	197,5	0,97	35,1	43,5
6	E.S.	206,1	0,91	34,8	39,5
7	İ.Y.	279,6	1,27	45,3	40,4
8	N.Ç.	241,8	1,35	43,2	41,1
9	R.V.	309,6	1,13	32,6	49,5
10	Y.K.	260,4	1,12	34,8	46,0
11	M.Y.	239,6	1,26	36,1	40,2
12	Ş.F.	428,9	1,49	54,5	64,3
13	A.M.	345,4	1,31	30,9	42,4
14	L.Ü.	216,1	1,13	38,8	36,9
15	İ.G.	286,1	1,06	27,3	38,8
16	Y.G.	202,5	0,93	35,8	43,4
17	H.E.	223,9	1,35	15,8	43,8
18	T.E.	247,5	1,37	22,1	43,1
19	C.F.	211,8	1,11	30,5	44,5
20	İ.Y.	226,1	1,20	35,6	38,3
21	S.A.E.	259,6	1,25	39,5	55,9
22	M.B.	278,9	0,66	26,1	31,2
23	M.Ş.	1361,1	3,32	234,5	204,1
24	D.K.	1378,2	3,21	151,0	149,1
25	H.Ö.	263,9	1,47	48,4	55,3
26	O.K.	229,6	1,27	31,3	39,3
27	G.K.	381,1	1,07	35,8	48,9
28	M.A.	336,1	1,14	37,9	44,3
29	F.Y.	594,6	1,64	54,1	97,8
30	Ü.B.	808,2	2,48	120,0	161,3
31	R.Ö.	376,1	0,97	46,9	44,4
32	S.H.	312,5	1,17	44,1	45,6
33	A.Ö.	323,9	1,40	38,0	56,3
34	M.A.	223,2	1,19	24,3	40,6
35	R.U.	316,1	1,12	33,4	42,2
36	A.A.	294,6	0,97	35,6	32,9
37	H.S.	451,8	1,02	44,1	73,2
38	H.S.	163,9	0,93	25,5	36,2
39	R.G.	452,5	1,11	44,8	65,9
40	Y.Y.	355,4	0,91	43,1	45,1

Tablo 15. Kronik Bruselloz Hasta Grubunda IL-35, IL-36, IL-37, IL-38 Sitokin Düzeyleri

No	İsim	IL-35 ng/ml	IL-36 ng/ml	IL-37 pg/ml	IL-38 ng/ml
1	U.T.	956,8	1,98	118,9	98,2
2	Y.G.	928,9	2,46	153,0	120,4
3	H.D.	256,1	1,05	51,3	29,4
4	F.B.	260,4	0,93	48,2	47,9
5	K.A.	1779,6	3,51	303,9	255,4
6	Ü.S.	1126,8	3,16	220,9	140,0
7	C.Ö.	698,2	2,11	107,1	83,3
8	E.S.	279,6	1,15	45,0	44,0
9	F.T.	711,1	2,24	88,0	67,6
10	Ş.Y.	305,4	1,27	51,0	46,1
11	S.Ö.	304,6	1,28	32,4	34,4
12	O.K.	369,6	1,31	43,1	34,1
13	A.K.	396,1	1,05	63,5	38,2
14	O.T.	361,8	1,42	64,7	37,6
15	H.K.	222,5	1,24	60,3	41,4
16	M.A.	235,4	1,07	49,9	45,3
17	Ö.C.	285,4	1,04	57,2	36,0
18	S.A.	238,2	1,16	34,7	29,8
19	D.E.	230,4	0,95	49,0	36,3
20	H.A.	283,2	0,85	46,3	33,4
21	A.D.	284,6	1,12	45,6	35,0
22	H.Ç.	282,5	1,23	47,8	34,5
23	G.A.	199,6	1,24	34,3	36,0
24	S.Ş.	334,6	1,29	37,9	35,0
25	A.O.G.	394,6	1,06	58,5	35,4
26	A.T.	392,5	1,86	72,2	47,2
27	İ.T.	380,4	1,29	60,1	42,8
28	A.İ.Ö.	398,2	1,31	60,3	38,7
29	İ.Ö.	376,1	1,36	55,5	37,8
30	İ.V.	319,6	1,41	48,8	36,9
31	İ.Ç.	904,6	2,88	150,3	145,2
32	O.A.	339,6	1,12	36,7	23,1
33	N.S.	336,8	1,23	48,7	36,3
34	R.K.	1708,2	3,55	298,4	243,1
35	H.K.	231,1	1,16	46,8	40,7
36	K.K.	371,1	1,42	42,9	46,7
37	N.P.	373,9	1,53	63,6	51,7
38	A.E.	300,4	1,20	57,4	46,7
39	Y.A.	352,5	1,35	74,0	63,2
40	N.E.	362,5	1,24	81,0	52,2

Tablo 16. Sağlıklı, Akut, Kronik Bruselloz Hasta Grubunda IL-39 Sitokin Düzeyleri

No	İsim	Kontrol (pg/ml)	İsim	Akut (pg/ml)	İsim	Kronik (pg/ml)
1	E.B.	10,8	K.P.	4,1	U.T.	9,0
2	M.A.K.	18,1	S.E.	3,0	Y.G.	9,9
3	E.A.	20,6	S.B.	5,9	H.D.	3,7
4	Z.K.	7,3	M.K.	0,4	F.B.	4,1
5	O.A.	9,5	U.E.	3,9	K.A.	20,0
6	C.Y.	6,2	E.S.	5,9	Ü.S.	16,8
7	R.T.	5,6	İ.Y.	5,8	C.Ö.	7,2
8	H.A.	7,9	N.Ç.	4,2	E.S.	3,7
9	R.A.	6,1	R.V.	5,5	F.T.	10,2
10	R.C.	7,2	Y.K.	5,1	Ş.Y.	3,8
11	H.B.O.	16,0	M.Y.	4,8	S.Ö.	5,3
12	İ.A.	7,3	Ş.F.	7,1	O.K.	7,3
13	F.A.	6,5	A.M.	6,4	A.K.	4,4
14	Ş.B.	7,7	L.Ü.	5,8	O.T.	5,9
15	M.K.	6,2	İ.G.	5,1	H.K.	5,9
16	H.D.	12,4	Y.G.	4,4	M.A.	5,3
17	M.Ö.	6,2	H.E.	3,1	Ö.C.	3,6
18	M.K.	7,9	T.E.	4,3	S.A.	5,8
19	H.D.	6,6	C.F.	2,9	D.E.	4,9
20	A.K.	6,9	İ.Y.	4,4	H.A.	5,6
21			S.A.E.	4,5	A.D.	6,3
22			M.B.	3,9	H.Ç.	7,2
23			M.Ş.	18,8	G.A.	5,7
24			D.K.	16,0	S.Ş.	4,6
25			H.Ö.	5,5	A.O.G.	4,7
26			O.K.	4,8	A.T.	8,4
27			G.K.	5,0	İ.T.	5,7
28			M.A.K.	6,1	A.İ.Ö.	6,7
29			F.Y.	7,4	İ.Ö.	6,1
30			Ü.B.	12,2	İ.V.	5,4

Sağlıklı kontroller ve hasta grupları arasında sitokin düzeylerindeki değişiklik ki kare testi ile değerlendirilmiştir. Test sonuçlarına göre, akut, kronik ve sağlıklı kontrol grupları arasında IL-35, IL-37, IL-38 ve IL-39 düzeylerinde anlamlı farklılık saptanırken IL-36 düzeyinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0,152$). Sağlıklı kontroller ve hasta grupları sitokin seviyeleri açısından istatistiksel olarak *Kruskal-Wallis* Testi ile değerlendirilmiştir.

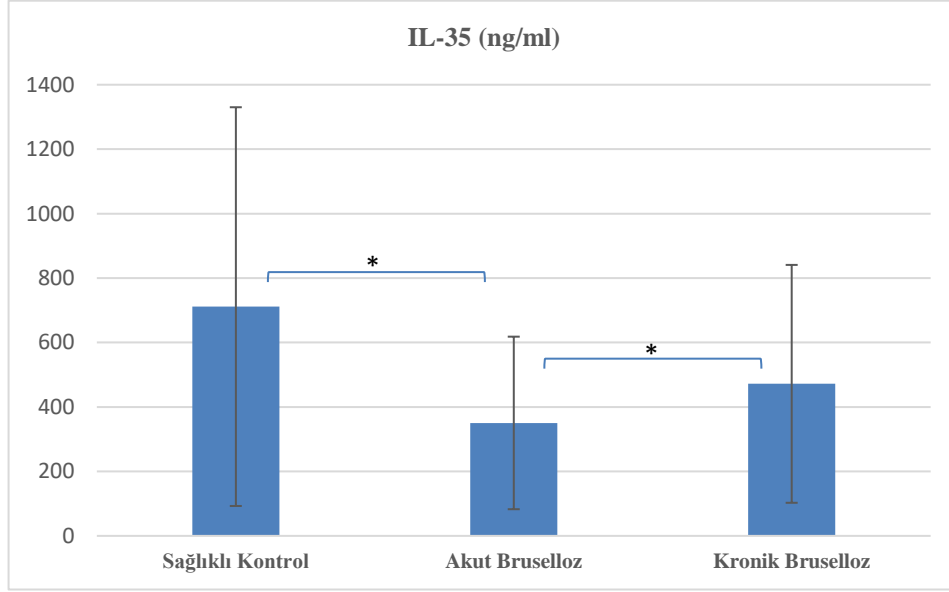
4.1.1. IL-35 Sitokin Düzeyi

IL-35 düzeyi açısından akut-kontrol ($p=0,002$) ve akut-kronik ($p=0,036$) bireyler arasında anlamlı farklılık saptanırken kronik-kontrol ($p=1$) grupları arasında anlamlı

farklılık gözlenmemiştir. Akut grup IL-35 düzeyi kronik gruptakinden daha düşük iken sağlıklı kontrol grubunun IL-35 düzeyi kronik gruptan daha yüksektir.

Tablo 17. Sağlıklı ve Akut, Kronik Bruselloz Hasta Grubunda IL-35 Sitokin Düzeyleri

	Sağlıklı Kontrol	Akut Bruselloz	Kronik Bruselloz
IL-35 (ng/ml)	711,5 ± 618,7	350,5 ± 267,7	471,8 ± 369,1



*: p<0,05

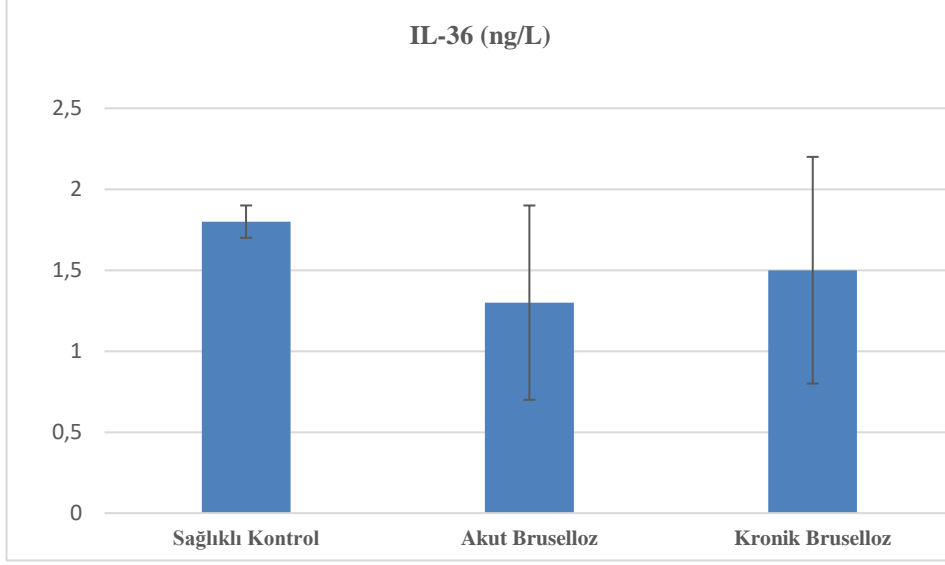
Şekil 13. Sağlıklı ve Akut, Kronik Bruselloz Hastalarında IL-35 Düzeyleri

4.1.2. IL-36 Sitokin Düzeyi

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde sağlıklı kontrol, akut ve kronik hasta gruplarının IL-36 sitokin düzeylerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p=0,152).

Tablo 18. Sağlıklı ve Akut, Kronik Bruselloz Hastalarında IL-36 Düzeyleri

	Sağlıklı Kontrol	Akut Bruselloz	Kronik Bruselloz
IL-36 (ng/L)	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,6	1,5 ± 0,7



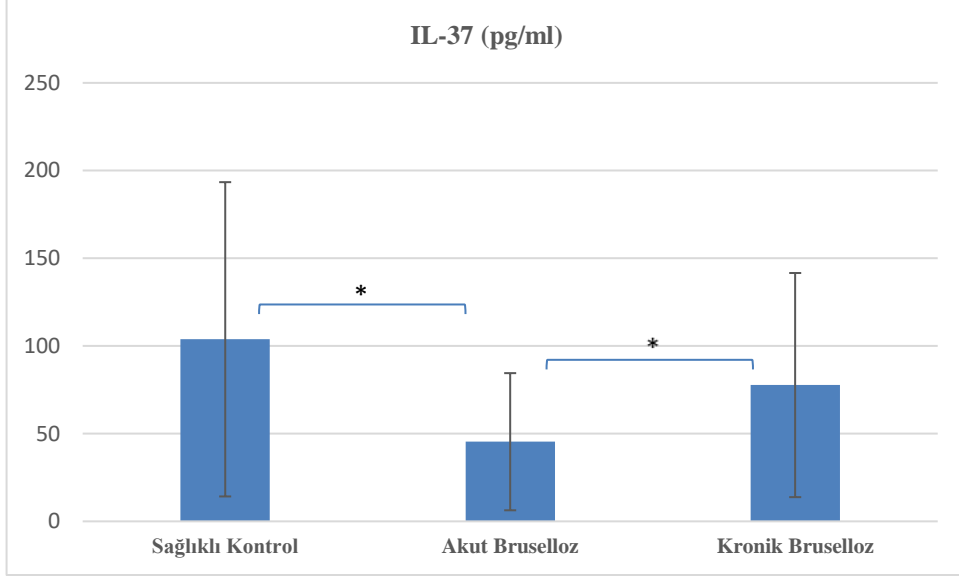
Şekil 14. Sağlıklı ve Akut, Kronik Bruselloz Hastalarında IL-36 Düzeyleri

4.1.3. IL-37 Sitokin Düzeyi

IL-37 düzeyi açısından akut-kontrol ($p=0,001$) ve akut-kronik ($p=0,001$) bireyler arasında anlamlı farklılık saptanırken kronik-kontrol grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Akut grup IL-37 düzeyi kontrol grubundakinden daha düşük iken kronik grubun IL-37 düzeyi akut grubundan daha yüksektir.

Tablo 19. Sağlıklı ve Akut, Kronik Bruselloz Hastalarında IL-37 Düzeyleri

	Sağlıklı Kontrol	Akut Bruselloz	Kronik Bruselloz
IL-37 (pg/ml)	103,8 ± 89,6	45,4 ± 39,1	77,7 ± 63,9



*: p<0,05

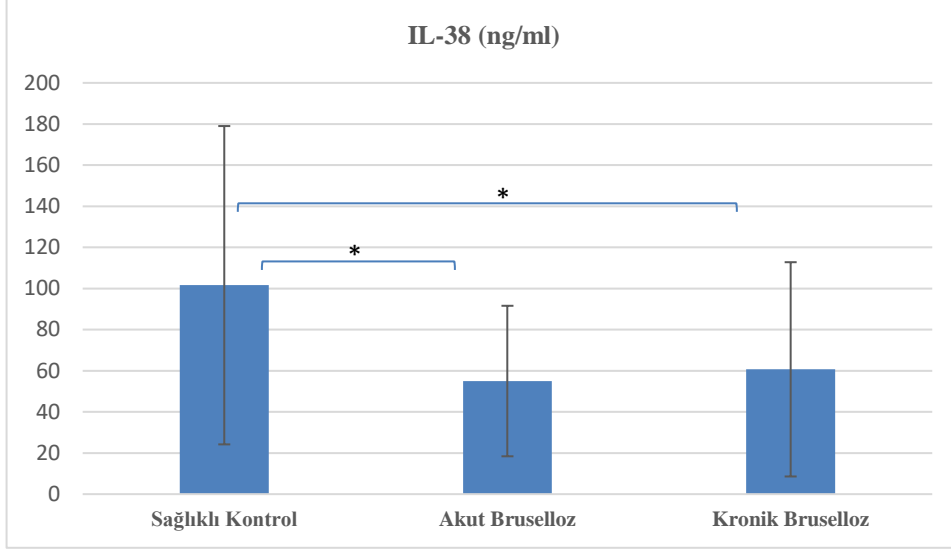
Şekil 15. Sağlıklı ve Akut, Kronik Bruselloz Hastalarında IL-37 Düzeyleri

4.1.4. IL-38 Sitokin Düzeyi

IL-38 düzeyi açısından akut-kontrol (p=0,001) ve kronik-kontrol (p=0,001) bireyler arasında anlamlı farklılık saptanırken akut-kronik grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Kronik grup IL-38 düzeyi akut gruptakinden daha yüksek iken sağlıklı kontrol grubunun IL-38 düzeyi hem akut hem de kronik gruptan daha yüksektir.

Tablo 20. Sağlıklı ve Akut, Kronik Bruselloz Hastalarında IL-38 Düzeyleri

	Sağlıklı Kontrol	Akut Bruselloz	Kronik Bruselloz
IL-38 (ng/ml)	101,6 ± 77,4	55 ± 36,6	60,7 ± 52,1



*: $p < 0,05$

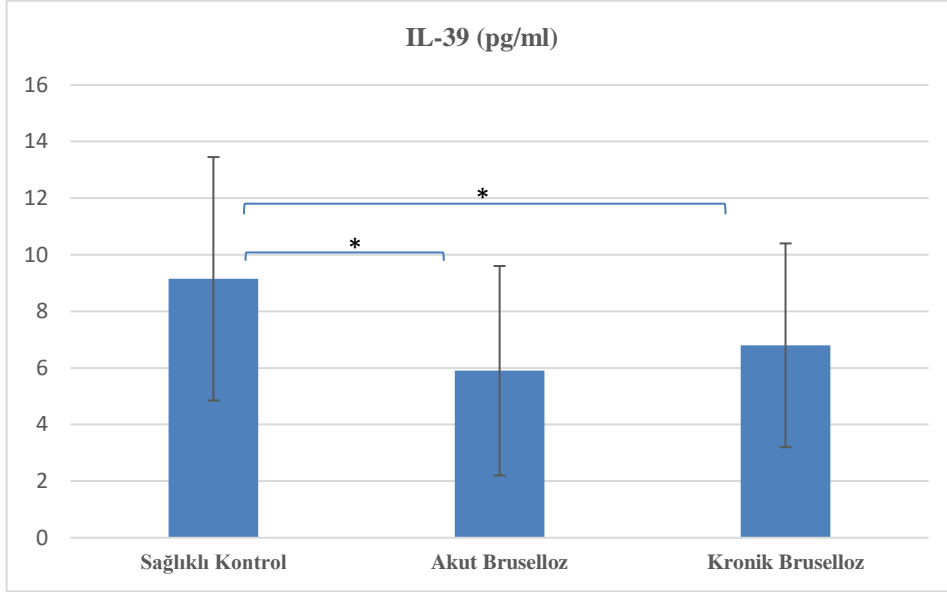
Şekil 16. Sağlıklı ve Akut, Kronik Bruselloz Hastalarında IL-38 Düzeyleri

4.1.5. IL-39 Sitokin Düzeyi

IL-39 düzeyi açısından akut-kontrol ($p=0,001$) ve kronik-kontrol ($p=0,008$) bireyler arasında anlamlı farklılık saptanırken akut-kronik ($p=0,359$) grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Kronik grup IL-39 düzeyi akut gruptan daha yüksek iken sağlıklı kontrol grubunun IL-39 düzeyi hem akut hem de kronik gruptan daha yüksektir.

Tablo 21. Sağlıklı ve Akut, Kronik Bruselloz Hastalarında IL-39 Düzeyleri

	Sağlıklı Kontrol	Akut Bruselloz	Kronik Bruselloz
IL-39 (pg/ml)	9,15 ± 4,3	5,9 ± 3,7	6,8 ± 3,6



*: p<0,05

Şekil 17. Sağlıklı ve Akut, Kronik Bruselloz Hastalarında IL-39 Düzeyleri

4.1.6. Ekstrasellüler Sitokin Düzeylerinin Karşılaştırılması

Sağlıklı kontrol ile akut ve kronik bruselloz hastalarının sitokin düzeylerinin istatistiksel olarak kıyaslandığı tablo aşağıda verilmiştir (Tablo 22).

Tablo 22. Sitokin düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

	IL-35	IL-36	IL-37	IL-38	IL-39
Akut-sağlıklı	*		*	*	*
Kronik-sağlıklı				*	*
Akut-kronik	*		*		

*: p<0,05

IL-35 ve IL-37 sitokinlerinin ekspresyon düzeyleri sağlıklı kontrol-akut (IL-35 için p=0,002; IL-37 için p= 0,001) ve akut-kronik (IL-35 için p=0,036; IL-37 için p=0,001) gruplarında benzerlik göstermektedir. Bu sitokinler, sağlıklı kontrol grubunda akut gruba göre daha fazla üretilirken, kronik grupta da akut gruba oranla daha fazla üretilmiştir. Sağlıklı kontrol-kronik grubu için sitokin düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. IL-36 hiçbir grupta ekspresyon düzeyi açısından anlamlı farklılık kaydetmezken, IL-38 ve IL-39 salınım profili sağlıklı kontrol-akut (IL-38 ve IL-39'un her ikisinde p=0,001) ve sağlıklı kontrol-kronik (IL-38 için p=0,001; IL-39 için

p=0,008) grupları açısından benzerlik göstermektedir. Her iki sitokin de sağlıklı kontrol grubunda hem akut hem de kronik hasta grubundan daha fazla düzeyde salınmaktadır.

Aralarında anlamlı farklılık saptanan sitokin gruplarında akut ve kronik hastalar KE tutulumu yönünden de kıyaslanmıştır (IL-36 anlamlı bulunmamıştır).

Tablo23. Akut ve kronik gruplarda KE tutulumu olan ve olmayan hastaların karşılaştırılması

	IL-35	IL-37	IL-38	IL-39
KE tutulumu (+) Akut-sağlıklı		*	*	*
KE tutulumu (-) Akut-sağlıklı	*	*	*	*
KE tutulumu (+) Kronik-sağlıklı			*	*
KE tutulumu (-) Kronik-sağlıklı			*	*
KE tutulumu (+) Akut-kronik		*		
KE tutulumu (-) Akut-kronik	*	*		*

*: p<0,05

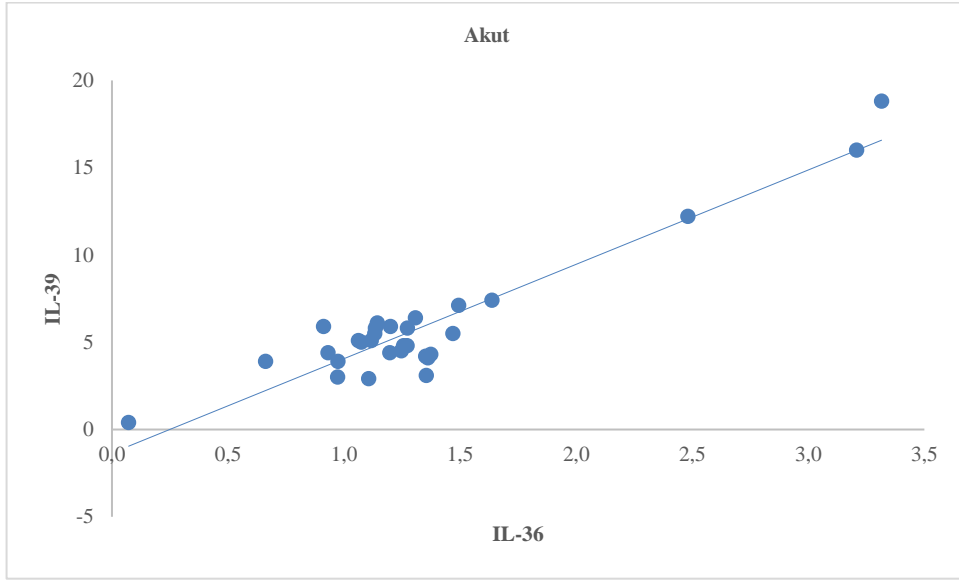
Tablo 23'te gösterildiği gibi, KE tutulumu olan akut-sağlıklı kontrol grupları arasında IL-37 (p=0,012), IL-38 (p=0,019) ve IL-39 (p=0,042) sitokin ekspresyonları bakımından anlamlı farklılık gösterdiği IL-35 salınımında ise anlamlı bir farklılık göstermediği gözlenmiştir. KE tutulumu olmayan akut-sağlıklı kontrol grupları arasında tüm sitokin düzeyleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p (IL-35, IL-37, IL-38, IL-39):0,001). KE tutulumu olan kronik-sağlıklı kontrol grubu ile KE tutulumu olmayan kronik-sağlıklı kontrol gruplarında ise IL-38 (sırasıyla p_{KE(+)}=0,031; p_{KE(-)}=0,001) ve IL-39 (sırasıyla p_{KE(+)}=0,03; p_{KE(-)}=0,003) sitokinlerinde farklılık gözlenirken IL-35 ve IL-37 sitokinlerinde anlamlı bir farklılık kaydedilmemiştir. KE tutulumu olan akut-kronik grupları arasında sadece IL-37 (p=0,024) ekspresyon düzeyi anlamlı bulunurken IL-35, IL-38 ve IL-38 sitokinlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. KE tutulumu olmayan akut-kronik grupları arasında ise IL-35 (p=0,009), IL-37 (p=0,001) ve IL-39 (p=0,04) sitokinlerinde anlamlı farklılık gözlenirken IL-38 sitokin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bunlara ek olarak sitokin grupları arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığını incelemek için Spearman korelasyon testi ile her bir sitokin grubunun düzeyleri akut ve kronik gruplarda karşılaştırılmıştır. Akut ve kronik

hasta gruplarında tüm sitokinlerin düzeyleri arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon gözlenmiştir. Korelasyon testi sonucunda elde edilen verilere ait grafikler aşağıda gösterilmiştir.

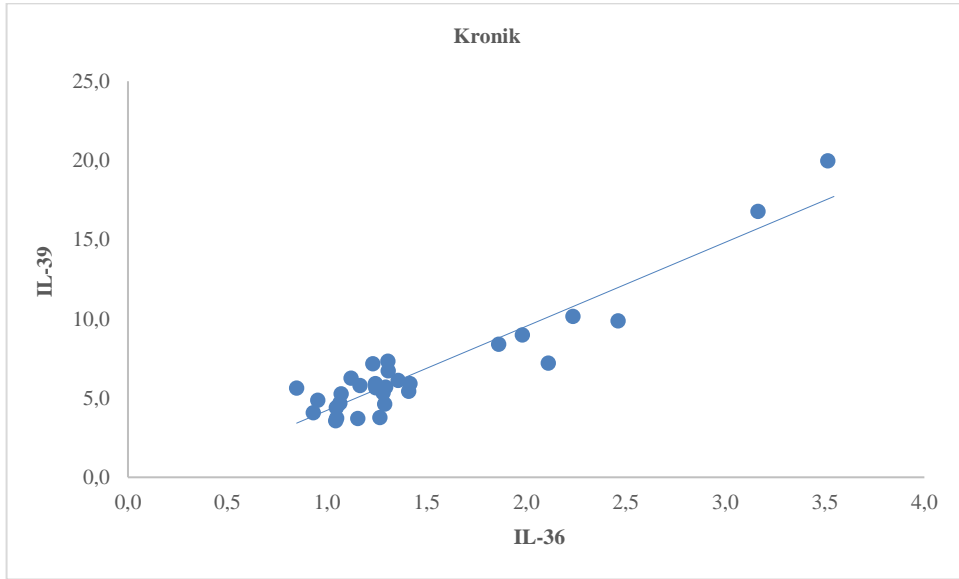
Pro-enflamatuvar sitokin gruplarına ait korelasyon grafikleri;

Şekil 19. a) Akut hasta grubunda IL-36 ve IL-39 düzeyleri arasındaki korelasyon ($r=0,759$, $p<0,05$) b) Kronik hasta grubunda IL-36 ve IL-39 düzeyleri arasındaki korelasyon ($r=0,78$, $p<0,05$)

a)



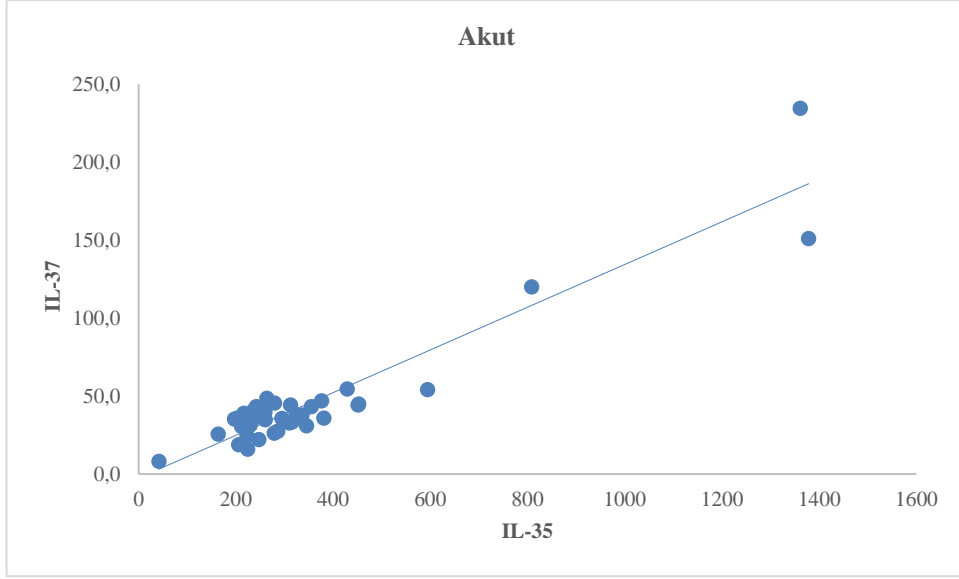
b)



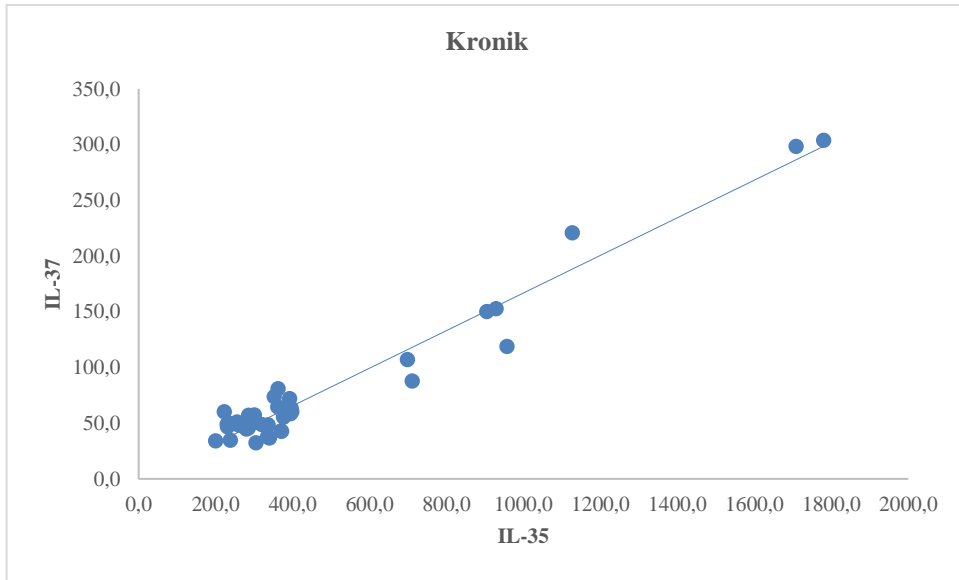
Anti-enflamatuvar sitokin gruplarına ait korelasyon grafikleri;

Şekil 20. a) Akut hasta grubunda IL-35 ve IL-37 düzeyleri arasındaki korelasyon ($r=0,67$, $p<0,05$) b) Akut hasta grubunda IL-35 ve IL-37 düzeyleri arasındaki korelasyon ($r=0,723$, $p<0,05$)

a)

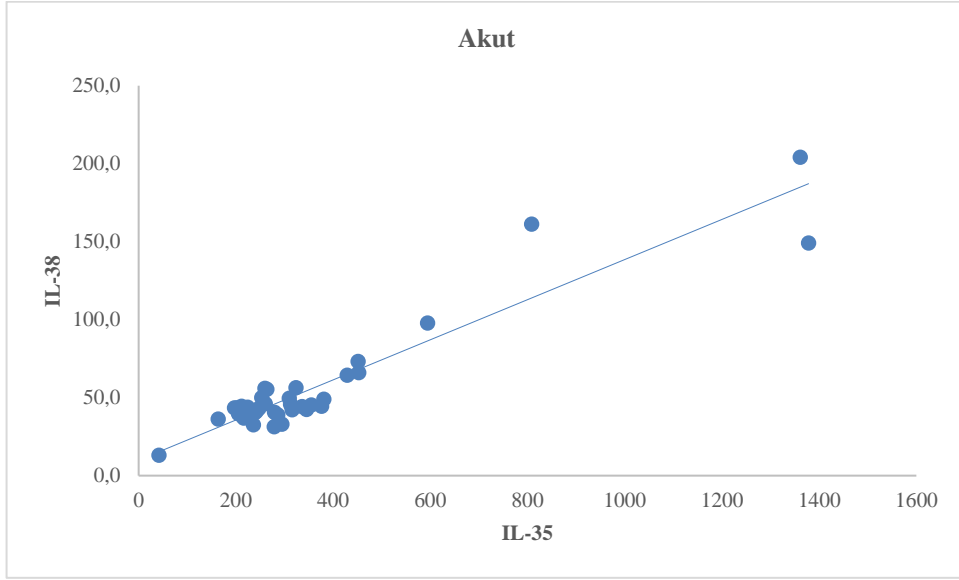


b)

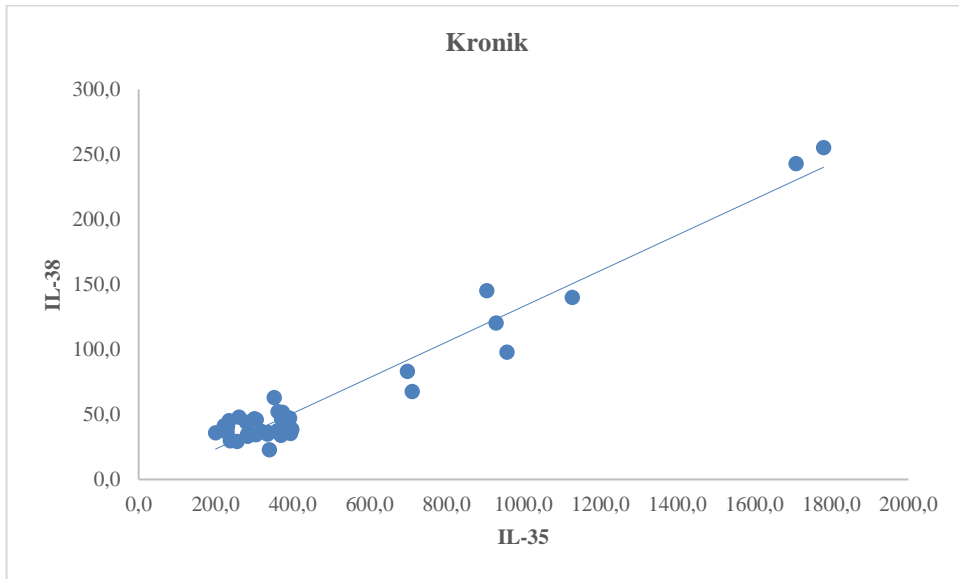


Şekil 21. a) Akut hasta grubunda IL-35 ve IL-38 düzeyleri arasındaki korelasyon ($r=0,691$, $p<0,05$) b) Akut hasta grubunda IL-35 ve IL-38 düzeyleri arasındaki korelasyon ($r=0,602$, $p<0,05$)

a)

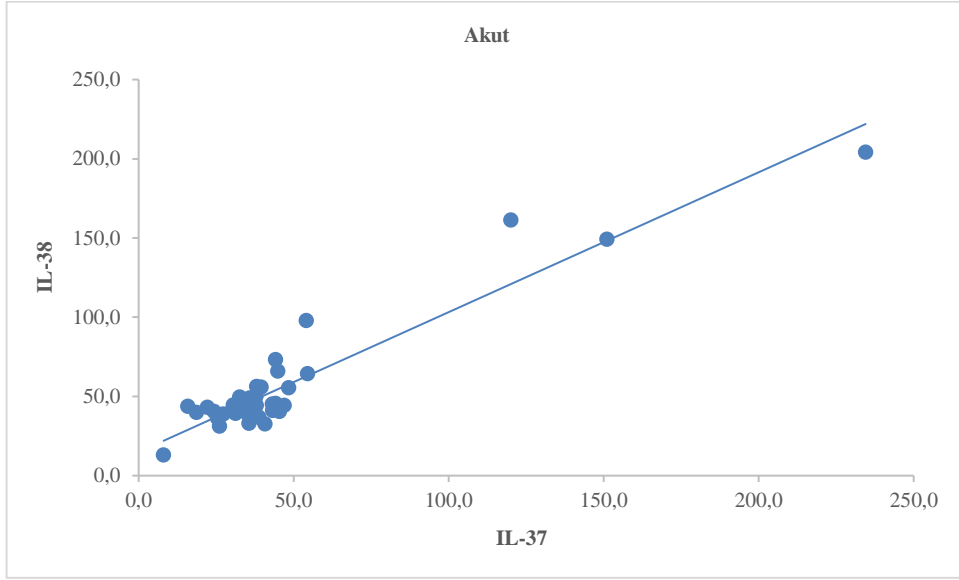


b)

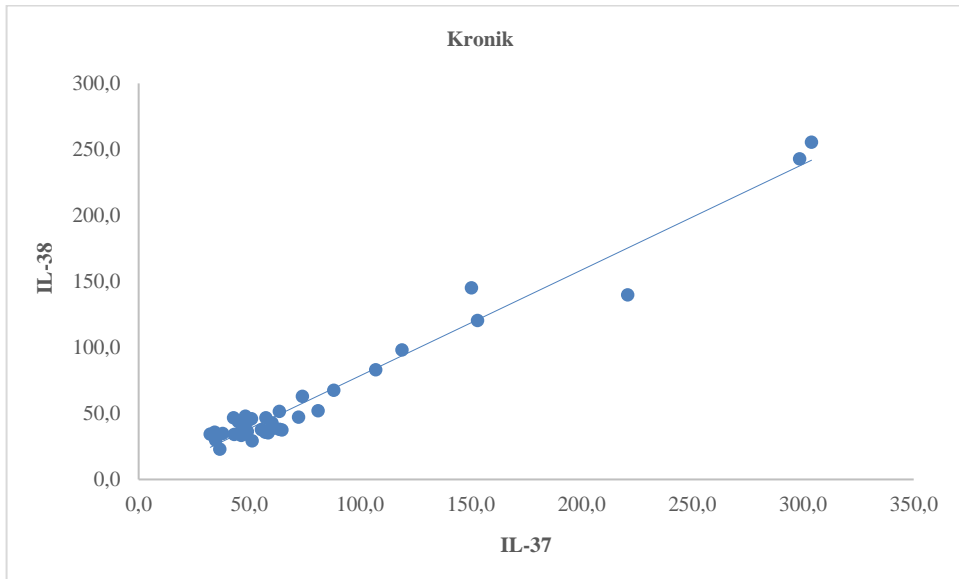


Şekil 22. a) Akut hasta grubunda IL-37 ve IL-38 düzeyleri arasındaki korelasyon ($r=0,636$, $p<0,05$) b) Akut hasta grubunda IL-37 ve IL-38 düzeyleri arasındaki korelasyon ($r=0,794$, $p<0,05$)

a)



b)



4.2. Moleküler Yöntemler (PCR) ile Elde Edilen Bulgular

Tüm RT-PCR sonuçları, *Abi Step One Plus Data Software* veri tabanından alınan delta CT (Δ CT)' ler şeklinde temin edilmiştir. Her bir sitokindeki her bir mRNA' nın ekspresyonunu web tabanlı program olan *RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5* (<https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/other-real-time-pcr-probes-or-primers-data-analysis-center/>) ile gerçekleştirilerek, tüm sitokinlerdeki her bir mRNA' nın Kat Değişimi (*Fold Change*) şeklinde belirlenmiştir. Bu istatistikler ve grafikler SPSS20 programı kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada kullanılan sitokinlere ait ilgili genler ve referans gen (*actin beta-ACTB*) ile birlikte tablo 23 ve 24'te gösterilmiştir.

Tablo 23. Kullanılan sitokinler ve ilgili genleri

Sitokinler	Genler
IL-35	Ebi3/IL-12A
IL-36	IL-36G
IL-37	IL-37
IL-38	IL1F10
IL-39	IL-23A/Ebi3

Tablo 24. Kullanılan Genlerin Tanımı

Gen	Tanım
ACTB	Actin, beta
EBI3	Epstein-Barr virus induced 3
IL23A	Interleukin 23, alpha subunit p19
IL12A	Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)
IL1F10	Interleukin 1 family, member 10 (theta) (interleukin 38)
IL37	Interleukin 37
IL36G	Interleukin 36, gamma

4.2.1. Referans Gen ACTB RT-PCR Sonuçları

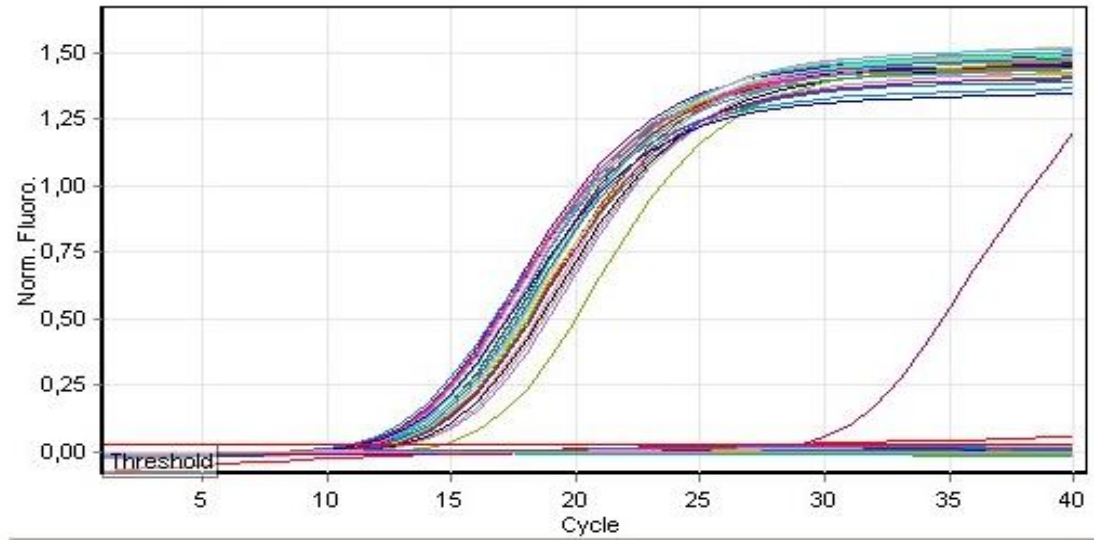
Çalışmada referans gen olarak ACTB kullanılmıştır. ACTB ekspresyon sonuçları örnek tablo ve şekilleri ile birlikte aşağıda verilmiştir.

Tablo 25. Rotor Gene RT-PCR Döngüsü Basamakları

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 30 secs, acquiring to Cycling A([Green])[1][1])

Sağlıklı kontroller ile akut ve kronik bruselloz hastalarından izole edilen örnekler *Rotor Gene* cihazında 95 °C’de 10 dakika bekledikten sonra, ilk basamak 95°C’de 15 saniye ve ikinci basamak 60°C’de 30 saniye olmak üzere 40 tekrarla inkübe edilmiştir.

Quantitation data for Cycling A.Green



Şekil 23. Döngü süresince florasans boyanmanın kantitatif sonuç değerleri

PCR analizi sonucunda cihazdan elde edilen *threshold* değerleri ve her bir bireye ait ACTB geninin kaçınıcı döngüden itibaren eksprese olmaya başladığı gösterilmiştir. ACTB’ya ait C_T değerleri Tablo 26’da gösterilmiştir.

Tablo 26. Sağlıklı kontrol, kronik ve akut bruselloz referans gen C_T değerleri

ACTB C_T Değerleri		
Sağlıklı Kontrol	Kronik	Akut
13,31	15,2	14,3
11,62	13,47	13,56
13,29	12,74	13,12
12,07	12,39	12,54
11,37	11,47	11,4
14,68	11,35	13,03
12,18	11,58	11,99
12,36	10,93	12,47
11,47	11,89	12,37
12,68		12,33
		12,34

4.2.2. IL-35 RT-PCR Sonuçları

4.2.2.1. EBİ3 Gen Ekspresyonu

Tablo 27. Sağlıklı kontrol, kronik ve akut bruselloz EBİ3 C_T değerleri

EBİ3 C_T Değerleri		
Sağlıklı Kontrol	Kronik	Akut
25,63	27,68	27,98
23,84	29,36	29,48
24,53	24,66	27,6
25,17	24,54	Undetermined
27,04	24,4	24,74
32,55	24,79	26,46
25,36	23,37	24,54
26,35	22,84	23,83
25,88	26,82	25,58
25,42		25,32
		27,05

4.2.2.2. IL12A Gen Ekspresyonu

Tablo 28. Sağlıklı kontrol, kronik ve akut bruselloz IL12A C_T değerleri

IL12A C _T Değerleri		
Sağlıklı Kontrol	Kronik	Akut
25,96	24,43	24,22
24,45	25,35	25,36
24,83	25,44	25,46
24,12	23,97	26,7
25,28	24,33	24,66
25,93	24,83	25,52
25,72	24,15	25,88
23,72	24,34	25,35
23,26	24,96	24,74
25,43		24,5
		24,74

4.2.3. IL-36 RT-PCR Sonuçları

4.2.3.1. IL36G Gen Ekspresyonu

Tablo 29. Sağlıklı kontrol, kronik ve akut bruselloz IL36G C_T değerleri

IL36G C _T Değerleri		
Sağlıklı Kontrol	Kronik	Akut
31,48	31,2	29,83
30,12	35,42	Undetermined
30,82	30,13	30,29
30,86	30,7	33,27
31,28	Undetermined	31,14
30,93	30,02	Undetermined
31,25	30,37	30,42
30,64	31,34	Undetermined
30,06	31,35	26,46
29,82		30,2
		31,46

4.2.4. IL-37 RT-PCR Sonuçları

4.2.4.1. IL37 Gen Ekspresyonu

Tablo 30. Sağlıklı kontrol, kronik ve akut bruselloz IL37 C_T değerleri

IL37 C _T Değerleri		
Sağlıklı Kontrol	Kronik	Akut
27,03	30,51	29,61
29,57	30,53	29,54
26,55	31,94	30,77
31,35	29,69	26,89
25,89	29,58	29,77
30,1	28,81	29,41
30,42	31,47	30,51
30,34	29,78	30,4
30,62	28,94	29,47
28,87		31,1
		29,17

4.2.5. IL-38 RT-PCR Sonuçları

4.2.5.1. IL1F10 Gen Ekspresyonu

Tablo 31. Sağlıklı kontrol, kronik ve akut bruselloz IL1F10 C_T değerleri

IL1F10 C _T Değerleri		
Sağlıklı Kontrol	Kronik	Akut
35,46	34,96	36,28
26,64	36,16	26,53
36,81	Undetermined	Undetermined
17,76	37,31	Undetermined
39,62	33,99	27,97
Undetermined	25,48	30,2
Undetermined	36,23	Undetermined
37,46	29,8	35,12
38,56	36,02	24,32
Undetermined		33,35
		Undetermined

4.2.6. IL-39 RT-PCR Sonuçları

4.2.6.1. EBI3 Gen Ekspresyonu

EBI3 C_T değerleri tablosu IL-35 RT-PCR sonuçlarında gösterilmiştir.

4.2.6.2. IL23A Gen Ekspresyonu

Tablo 32. Sağlıklı kontrol, kronik ve akut bruselloz IL23A C_T değerleri

IL23A C _T Değerleri		
Sağlıklı Kontrol	Kronik	Akut
25,96	23,75	24,08
24,45	24,27	24,25
24,83	24,08	25,46
24,12	24	26,7
25,28	23,79	24,66
25,93	24,09	25,52
25,72	22,99	25,88
23,72	23,18	25,35
23,26	23,62	24,74
25,43		24,5
		24,74

4.2.7.Gen Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, akut, kronik ve sağlıklı kontrol gruplarının 2^{-ΔCt} (-Avg. (ΔCt)), kat değişimi ve p değerleri ile akut ve kronik grupların karşılaştırıldığı tablolar aşağıda gösterilmiştir (Tablo 33, 34).

Tablo 33. Sağlıklı kontroller ile Akut, Kronik Bruselloz Hastalarının $2^{(-Avg.(\Delta Ct))}$, kat değişimi ve p değerlerinin karşılaştırılması

Genler	Kontrol	Akut			Kronik		
		$2^{(-Avg.(\Delta Ct))}$	Kat Değişimi*	p değeri*	$2^{(-Avg.(\Delta Ct))}$	Kat Değişimi*	p değeri*
ACTB	1	1	1	0	1	1	0
Ebi3	0,000077	0,000034	0,444	0,559573	0,000118	1,5423	0,558189
IL-23A	0,000189	0,000183	0,9651	0,667078	0,000366	1,9323	0,188598
IL-12A	0,000189	0,000169	0,892	0,952946	0,000197	1,0411	0,511834
IL1F10	0	0	2,6587	0,314208	0	1,5419	0,358231
IL-37	0,00001	0,000007	0,7261	0,200815	0,000004	0,4256	0,108915
IL-36G	0,000003	0,000001	0,2298	0,444847	0,000001	0,303	0,707156

*: Sağlıklı kontrollere göre

Tablo 34. Akut ve kronik hasta gruplarının karşılaştırılması

Genler	Akut-Kronik		
	$2^{(-Avg.(\Delta Ct))}$	Kat Değişimi*	p değeri*
ACTB	1	1	0
Ebi3	0,000034	0,365	0,55799
IL-23A	0,000183	0,4602	0,19802
IL-12A	0,000169	0,7487	0,403647
IL1F10	0	1,8457	0,3917
IL-37	0,000007	1,2509	0,516293
IL-36G	0,000001	0,8121	0,516148

*: akut kroniğe göre

Tabloda kronik grubun kat değişimi değerleri akut gruba göre daha yüksektir. Sadece IL-37 geninin kat değişim değeri akut grupta kronik gruptakinden yüksektir (~1,7 kat). p değerleri ise hem akut hem de kronik grupta $p < 0,05$ 'e uygun değildir (referans gen-ACTB hariç). Gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. p değerleri her bir hasta ve kontrol grubunun $2^{(-Avg.(\Delta Ct))}$ değerlerinden yararlanılarak *Student's T* testi yöntemiyle hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bruselloz dünya genelinde yaygın görülen bir hastalıktır. Brusellozun farklı formları bulunmakla birlikte akut formdan kronikleşmeye gidişteki mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu karmaşık sürece çoklu bakteriyel koşulların yanı sıra konak faktörü de dahil edilebilir. *Brucella* enfeksiyonunun regülasyonunda pek çok etken bulunmaktadır. En önemli etkenlerden biri de sitokinlerdir. İmmünomodülatör sitokinler bakterinin konağa ilk giriş anından itibaren tanınması ve konağın immün sistemi tarafından yanıt oluşturulması süreçlerinin anahtar elemanlarıdır. Enfeksiyonların lokal bir alanda sınırlandırılarak patojenin etkisiz hale getirilmesini sağlayan koruyucu immün mekanizmaların anlaşılması; farklı hasta gruplarında, özellikle *Brucella* enfeksiyonlarında etkin spesifik immün yanıtın ortaya konmasına ve elde edilen bilgiler ışığında daha etkili yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Bu amaçla çalışmamızda, *Brucella* enfeksiyonlarında immünomodülatör sitokinlerin immün cevaptaki rolü araştırılmıştır. *Brucella*'ya karşı oluşan koruyucu immün cevabın hücresel ve moleküler temellerinin anlaşılması; hastalığın kontrolünde etkili olabilecek spesifik tanı reaktiflerinin hazırlanmasında ve tedavi için alternatif immün modülatör yaklaşımların belirlenmesinde önemli yararlar sağlayabilir.

Konağın patolojik özellikleri ve savunma mekanizmasına göre, immün sistem hücreleri etkili bir yanıt oluşturmak ve hücrelerarası iletişimi sağlayabilmek için çeşitli biyolojik ürünler üretirler. Bu ürünler arasında sitokinler çok sayıda enfeksiyonun, oto-reaktif bozukluğun, allerjik hastalıkların oluşumuna ve ilerlemesine etki eden önemli mediatörlerdir. Genellikle pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar olarak sınıflandırılan sitokinler çeşitli hücre popülasyonları tarafından salınırlar. Hem pro-enflamatuvar hem de anti-enflamatuvar sitokinler bir enfeksiyonun farklı aşamalarında immünojenlere karşı belirgin yanıtlar oluştururlar. Ayrıca, benzer uyaranlara karşı üretilen sitokin yanıtları farklı bireyler ve türler arasında hastalığın yapısına bağlı

olarak (kronik, akut, patojenik veya otoreaktif) farklılık gösterir. Geçtiğimiz on yılda immünomodülatör sitokin araştırmalarının çeşitli hastalık modellerinde ilgi odağı olduğu görülmektedir. İmmün sistemi aktive etme ve süprese etme özelliklerinin yanı sıra terapötik uygulanma potansiyelleri de söz konusudur. Otoimmün hastalıklar, çeşitli kanser türleri ve bulaşıcı enfeksiyon hastalıkları gibi birçok hastalık türünde bu kullanım potansiyellerine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmada yeni immünomodülatör sitokinlerin Bruselloz hastalarındaki serum düzeyleri ve PKMH'lerindeki gen ekspresyon seviyelerine bakılmıştır.

IL-35, IL-12 sitokin ailesinin yeni bir üyesidir. IL-12A ve Ebi3 olarak adlandırılan iki ayrı gen tarafından kodlanır. Birçok patolojik sürece dahil olan anti-enflamatuvar bir sitokindir (Li ve ark., 2012). IL-35'in etkinliği ile ilgili çalışmalarda farklı hasta grupları ve çeşitli çalışma metodları kullanılmaktadır. Guillain-Barre sendromu (GBS) olan hastalarda yapılan bir çalışmada IL-35 düzeyi, serum ve serebral spinal sıvı (CFS) örneklerinde incelenmiştir. GBS'nin alt tiplerinden olan akut motor aksonal nöropatili (AMAN) ve akut enflamatuvar demiyelinizan poliradikülönöropatili (AIDP) hastalarda IL-35 düzeyi sağlıklı kontrollere göre anlamlı ölçüde azalma göstermiştir. Çalışmada IL-35'in GBS'li hastalarda koruyucu olabileceği ve hastalık oluşumunun saptanmasında önemli bir biyomarker olarak rol oynayabileceği gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2017). Romatoid artritli hastalardaki IL-35 salınımı ile ilgili çalışmada bu sitokin otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli bir rolü olduğu gözlenmiştir. Romatoid artritli hastalardan alınan serum örneklerindeki IL-35 seviyesi sağlıklı kontrollere göre önemli derecede azalma göstermiştir (Ning ve ark., 2015). Bir diğer çalışmada IL-35'in gebelik ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmaya sağlıklı gebe, gebe olmayan ve rekürren spontan abortus vakaları dahil edilerek IL-35 seviyesindeki değişimler izlenmiştir. Çalışmada IL-35 serum düzeyi sağlıklı gebe kadınlarda artış gösterirken rekürren spontan abortus vakalarında azalma göstermiştir. Bu durum IL-35'in başarılı bir gebelik için gerekli immünolojik faktörlerden biri olabileceği konusunda fikir vermektedir (Yue ve ark., 2015). Otoimmün ensefalomyelitte (Liu ve ark., 2018) immün toleransla ilişkili olarak IL-35 serum düzeylerinde artış gözlenirken koroner arter hastalığı (CAD) olan bireylerde IL-35 plazma seviyesinde azalma raporlanmıştır (Sanchez et al, 2017). Bir diğer çalışmada, sepsisli yetişkin ve çocuk hastalardan alınan serum örneklerinde IL-35 konsantrasyonu sağlıklı kontrollere göre

daha yüksek bulunmuştur. IL-35 düzeyi sepsisin şiddetine göre giderek artış göstermiştir. Artan IL-35 düzeyi, lojistik organ disfonksiyonu (LOD) ve enflamasyon markerleri ile ilişkilendirilmiştir. Sepsis süresince IL-35 ile IL-6, IL-8, IL-27, IL-10 ve TNF- α sitokinleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Fare anti-IL-35p35 antikoru ile nötralize IL-35 etkisinin incelendiği fare modellerinde peritoneal nötrofil sayısında artış gözlenmiştir. Ayrıca pro-enflamatuvar mediatörlerin salınımının da daha yüksek titrelere ulaştığı saptanmıştır. Çalışmada IL-35 subunitleri Ebi3 ve p35'in de ekspresyon düzeylerinde artış kaydedilmiştir (Du et al, 2016). Postinfluenza pnömokokal pnömoni çalışmak üzere tasarlanan bir fare modelinde, IL-35'in bu enfeksiyona karşı konak savunmasındaki rolü değerlendirilmiştir. Klinik analiz sonuçları influenza ile enfekte hastalarda IL-35 düzeyinin sağlıklı bireylere oranla arttığını göstermiştir (Chen ve ark., 2016). IL-35'in kronik HBV (Hepatit B Virus) enfeksiyonlarındaki rolünün araştırıldığı başka bir çalışmada ise kronik hastaların sağlıklı kontrollere göre IL-35 serum ve mRNA düzeylerinde önemli derecede azalma gözlenmiştir (Sheng-Tao ve ark., 2018). Kronik HBV hastalarıyla yapılan bu çalışmada IL-35 düzeyinde azalma gözlenmesi çalışmamızda elde ettiğimiz kronik bruselloz hastalarının IL-35 düzeyindeki azalmayla benzerlik göstermektedir. Bizim çalışmamızda da IL-35 serum düzeyleri kronik Bruselloz hastalarında sağlıklı kontrollere göre azalmıştır. Akut hastalarda ise kronik hasta grubundan daha düşük düzeydedir. IL-35 ve *Brucella* enfeksiyonu arasındaki ilişki ile ilgili henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sonuç, IL-35 sitokin düzeylerinin hücre içi mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlara karşı dirençte ve kronikleşmede rol oynayabileceğini düşündürmektedir. PKMH'lerde mRNA ekspresyonu Ebi3 ve IL-12A için kronik hasta grubunda akut hasta grubundan daha yüksek çıkmasına rağmen akut, kronik ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

IL-36, dört temel elemandan oluşan (IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra) yeni bir IL-1 ailesi üyesidir. Pro-enflamatuvar özellikteki bu sitokinin çeşitli hastalıkların gelişiminde görev aldığı gösterilmiştir. Enflamasyonun regülasyonunda merkezi bir rol oynayan IL-36 sitokinleri, deri hastalıkları, artrit ve pulmoner rahatsızlıkların yanı sıra birçok enfeksiyöz hastalığa aracılık etmektedir. Yapılan araştırmalar, IL-36 sitokinlerinin, agonistler ve antagonistler arasında gerçekleştirdiği özgün işlevleri nedeniyle insan hastalıklarının patogeneze katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Çalışmalarda IL-36'nın HSV-1 enfeksiyonuna karşı koruma sağladığı ancak edinsel immün yanıtın başlamasını düzenlemediği bildirilmiştir. IL-36'nın HSV-1'e karşı immün yanıtındaki rolü enfekte fare modelleri kullanılarak incelenmiştir. Ekspresyon analizleri sonucu IL-36 α ve IL-36 β mRNA düzeylerinin arttığı, IL-36 γ düzeyinin ise değişmediği gözlenmiştir. Çalışma sonucunda ise IL-36 β 'nın bilinmeyen fonksiyonlarının HSV-1 enfeksiyonuna karşı koruyucu olabileceği öne sürülmüştür (Milora ve ark., 2017). Tüberküloza karşı konak savunmasında IL-36'nın rolünün araştırıldığı başka bir çalışmada, *M. tuberculosis* ile enfekte makrofajların IL-36 γ üretimini iki basamakta düzenlediği gözlenmiştir. Birinci basamakta mikrobiyal ligandlar TLR ve MyD88 bağımlı yolları IL-36 γ salınımı için uyarırken ikinci basamakta endojenik IL-1 β ve IL-18, IL-36 γ sentezini çoğaltır. Ayrıca IL-36 γ 'nın insan makrofajlarında *M. tuberculosis* gelişiminin inhibisyonunu desteklediği gösterilmiştir. Çalışmada IL-36 γ 'nın tüberküloz enfeksiyonunda uyarıcı ve regülatör bir role sahip olduğu öngörülmüştür (Ahsan et al, 2016). IL-36 ve *Brucella* enfeksiyonu arasındaki ilişki ile ilgili henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda IL-36 seviyeleri akut ve kronik bruselloz vakalarında sağlıklı kontrole göre daha düşük düzeyde olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Akut ve kronik hasta gruplarının mRNA (IL-36G)'ları da sağlıklı kontrol grubuna göre daha az eksprese olmasına rağmen gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuç, pro-enflamatuvar bir sitokin olan IL-36 üretiminin *Brucella* bakterisi tarafından baskılandığını düşündürmektedir. Bu süpresyon mekanizmalarını açığa çıkarmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

IL-37, enflamasyonu azaltan ve immün yanıtı baskılayan anti-enflamatuvar bir sitokindir. IL-1 ailesinin 7. üyesidir (IL1F7). IL-37'nin anti-enflamatuvar özellikleri, SLE, IBD ve hepatosellüler karsinom gibi birçok kronik enflamatuvar hastalıklar ve tümörlerle ilişkilidir (Dinarello ve Bufler, 2013). Imaeda ve ark., IL-37 β 'nın IBD hastalarının kolon dokusunda yüksek düzeyde eksprese olduğunu ve ekspresyon düzeyi ile hastalığın derecesi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir. In vitro çalışmada ise IL-37 β 'nın T hücre ve DH aktivasyonunu inhibe ettiği ve böylece intestinal enflamasyonu azalttığı gözlenmiştir (Imaeda et al, 2013). Song ve ark., IL-37 serum düzeylerinin SLE hastalarında sağlıklı kontrollere oranla oldukça yüksek olduğunu göstermiştir. IL-37 düzeyi glukokortikoid ile tedavi sonrası azalmış ve IL-

37 düzeyi IL-18, IFN- γ ve IL-6 ile pozitif korelasyon göstermiştir (Song ve ark., 2013). Ye ve ark., PKMH'lerdeki IL-37 mRNA'ları ve SLE hastalarının serum IL-37 düzeylerinin sağlıklı bireylere göre önemli oranda yüksek olduğunu göstermiştir. Çalışma sonucunda IL-37'nin SLE etkinliği ile ilişkili olduğu düşünülmüş ve IL-37'nin SLE'de koruyucu bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Ye ve ark., 2014). RA hastalarında ise IL-37 serum düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre oldukça yüksek olduğu göstermiştir (Zhao ve ark., 2014). In vitro çalışmalar ise IL-37'nin IL-17, IL-1 β ve IL-6 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı ve Th17 lenfositlerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca, IL-37'nin Th17 hücre farklılaşması üzerinde etkisi olmadığı da saptanmıştır (Ye ve ark., 2015). Lunding ve ark., alerjik astımlı çocuklarla yaptığı çalışmada, PKMH'lerde IL-37 salınımının sağlıklı kontrollere göre daha düşük olduğunu saptamıştır (Lunding ve ark., 2015). Ayrıca, Guillan-Barre sendromu, ankilozan spondilit ve Graves hastalığında IL-37 seviyelerinin sağlıklı bireylere göre daha yüksek oranda eksprese olduğu da saptanmıştır. HIV-1 ile yapılan çalışmalarda IL-37'nin artan ekspresyonunun enflamasyonu sınırlayarak HIV-1'in regülasyonunda rol oynadığı raporlanmıştır. PKMH'lerde HIV-1 DNA düzeyi ile IL-37 mRNA düzeyi arasında pozitif bir korelasyon olduğu ancak anlamlı bir farklılık bulunmadığı gözlenmiştir (Poizot-Martin ve ark., 2013). IL-37'nin HIV enfeksiyonu ile ilişkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise kronik HIV-1 hastalarının PKMH'lerindeki IL-37 mRNA düzeylerinin sağlıklı kontrollere oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda total viral HIV-1 DNA'sı ile IL-37 mRNA'sı arasında önemli bir korelasyon olduğu saptanmıştır. IL-37 mRNA düzeyinin kronik HIV-1 enfeksiyonu tarafından etkilendiği gösterilmiştir (Højen et al, 2015). *Aspergillus* enfeksiyonlu fare modellerine yapılan IL-37 enjeksiyonu sonucunda bu sitokin NLRP3 inflamazom aktivasyonu, enflamatuvar faktörler, kemotaktik faktörler, nötrofil infiltrasyonu, akciğer hasarı ve kistik fibrozis düzeyini azalttığı gözlenmiştir (Moretti et al, 2014). IL-37'nin tüberkülozdaki etkinliğinin incelendiği bir diğer çalışmada, bu sitokin düzeyinin tüberküloz hastalarında azaldığı gözlenmiştir. IL-37 düzeyi ile IFN- γ ve IL-12 arasında negatif korelasyon görülürken, IL-37 ile IL-10 ve TGF- β düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur. IL-37 üretimi aktif tüberküloz hastalarının PKMH'lerinde engellenirken, IFN- γ ve IL-10 üretimi önemli derecede artmıştır.

Çalışmada, tüberküloz hastalarında IL-37 ekspresyonu ile IFN- γ , IL-12, IL-10 ve TGF- β düzeyleri arasında yakın ilişki olduğu ve IL-37'nin tüberküloz patogenezi süresince enflamatuvar sitokin IFN- γ 'nın süpresyonunu desteklediği saptanmıştır. IL-37, in vitro ortamda makrofajlarda fagositik aktiviteyi ve NO üretimini inhibe eder. Ayrıca, makrofajların M2-benzeri bir fenotipe kaymasını uyararak tüberküloz enfeksiyonunda patolojik bir rol oynadığı düşünülmektedir (Huang ve ark., 2015). Tüberküloz hastalarıyla yapılan çalışmada IL-37 düzeyinde azalma gözlenmesi çalışmamızda elde ettiğimiz bruselloz hastalarının IL-37 düzeyindeki azalmayla benzerlik göstermektedir. Bizim çalışmamızda serumdaki IL-37 düzeyi, bruselloz hastalarında sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında azaldığı, kronik hastalarda akut hastalara oranla istatistiksel olarak anlamlı biçimde artmış olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar IL-37'nin hücre içi bakteriyel enfeksiyonlu hasta gruplarında benzer biçimde davrandığını ortaya koymuştur. Anti-enflamatuvar özellikteki bu sitokinin akut hastalar ile kıyaslandığında kronik bruselloz hastalarında yüksek bulunması, kronisiteye dönüşümü açıklayabilir.

IL-38 (IL1F10) IL-1 ailesinin üyelerindedir. IL-1Ra ve IL-36Ra ile yapısal benzerlik gösterir. Anti-enflamatuvar özelliktedir. Enflamatuvar yanıtları baskılar ve immün yanıtların düzenlenmesinde görev alır. Bu çalışmada, IL-38 mRNA düzeyi, kalp, plasenta, fetal karaciğer, deri, dalak, timüs ve tonsil dokularında ölçülmüştür. IL-38'in daha çok deride ve tonsillerin proliferatif B hücrelerinde eksprese olduğu gözlenmiştir (Lin ve ark., 2001). Ancak immün olmayan dokularda (kalp, plasenta) IL-38 daha düşük seviyede eksprese olmuştur (Kumar ve ark., 2000). Bazı IL-1 ailesi üyeleri sürekli üretilirken bazıları bakteri veya enflamatuvar mediatörler aracılığıyla endüklenebilir ekspresyona sahiptir. Yapılan çalışmalar IL-38'in IL-36 aracılı enflamatuvar hastalıklarla yakın ilişkide olduğunu göstermektedir. Boutet ve arkadaşları (2016), IL-38 mRNA düzeylerinin RA hastalarının sinoviyal dokularında sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğunu saptamıştır. IL-38'in sinoviyal sıvıdaki lökosit (özellikle monosit) sayısı ve IL-1 β , IL-1Ra, CCL3, CCL4 ekspresyon seviyeleri ile ilişkisi olduğunu göstermiştir. Çalışma sonucunda IL-38 salınımının artrit hastalarında artış gösterdiği ve hastalık patogenezinde negatif bir rol oynadığı öngörülmüştür (Boutet ve ark., 2016). Diğer bir çalışmada ise IL-38'in aktif SLE hastalarında sağlıklı kontrollere oranla yüksek düzeyde olduğu saptanmış ve IL-38'in

SLE gelişimini zayıflattığı sonucuna ulaşılmıştır (Rudloff ve ark., 2015). IBD (ülseratif kolit ve Crohn hastalığı)'li bireylerde IL-38 mRNA seviyeleri, IL-1 β , IL-17A ve IL-6 ekspresyonu ile korele şekilde sağlıklı kontrollere göre daha yüksek oranda bulunmuştur (Boutet ve ark., 2016). Bunun dışında psöriasis, kronik obstruktif akciğer sendromu, oksijenle endüklenen retinopati gibi çeşitli hastalıklarda da IL-38 salınım düzeyinin sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. IL-38'in biyolojik fonksiyonunu araştırmak için yapılan çalışmalarda, bu sitokinin fungal endüklü Th17 yanıtlarını baskıladığı gözlenmiştir (van de Veerdonk ve ark., 2012). siRNA ve IL-38'in PKMH'lerde baskılandığı bir diğer çalışmada ise IL-6, APRIL ve CCL2 üretiminde artış saptanmıştır. Ayrıca IL-38'in LPS ve IL-1 β uyarımına yanıt olarak pro-enflamatuvar sitokin üretimini arttırdığı ve agonist bir etki gösterdiği de raporlanmıştır (Rudloff ve ark., 2015). Bir başka çalışmada, artan IL-38 düzeyleri ile anti-viral terapi almayan kronik hepatit B hastalarındaki karaciğer hasarı arasında bir korelasyon olduğu ve terapi alanlarda IL-38 seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak IL-38'in karaciğer hastalığında koruyucu bir rolü olduğu düşünülmüştür (Hong-Juan ve ark., 2016). Çalışmamızda, IL-38 serum düzeyleri akut ve kronik Bruselloz hasta gruplarında sağlıklı kontrollere oranla düşük bulunmuştur. Kronik vakalarda akut vakalara oranla daha yüksek bulunmuştur. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı olmasa da IL-38'in kronik enfeksiyona dönüşümde rol oynadığını düşündürmektedir.

IL-39, IL-12 ailesine ait yeni pro-enflamatuvar bir sitokindir. IL-39 ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamakla birlikte yapılan çalışmalarda IL-39'un uyarıcı ajanlara yanıt olarak makrofajlarda yüksek oranda üretildiği gösterilmiştir (Ushach, 2015). Ayrıca, TNF- α , IL-17 α ve IL-12 gibi çeşitli sitokinlerin makrofajlarda IL-39 üretimini arttırdığı, TGF- β ve IFN- γ 'nın ise bu sitokin üretimini inhibe ettiği raporlanmıştır (Ushach, 2015). Esas olarak makrofajlar tarafından üretilen, büyük miktarlarda dolaşımda bulunan ve immünomodülatör aktiviteye sahip bu sitokinin nötrofillerin üretimini ve farklılaşmasını da endüklediği gözlenmiştir (Ushach, 2015). Yapılan çalışmalarda IL-39 (Ebi3/IL-23p19) kimera proteininin insan lökositlerini uyarmada başarısız olduğu ve STAT3 sinyalizasyonu göstermediği raporlanmıştır. Bu durum fare modellerinde denendiğinde ise IL-39'un aktivite gösterdiği ve STAT3 aktivasyonunu sağladığı gözlenmiştir (Bridgewood ve ark., 2019). Bir diğer

çalışmada, IL-39'un lupus-benzeri fare modellerinde LPS ile uyarılmış B hücreler ve GL7⁺ aktive B hücrelerden üretildiği gözlenmiştir. Çalışma sonucunda IL-39'un lupus benzeri fare modellerinde STAT1/STAT3 aktivasyonu aracılı enflamatuvar yanıtla yardımcı olduğu ve SLE'nin immünopatojenik mekanizmalarını destekleyebileceği düşünülmüştür (Wang ve ark., 2016). Brusellozlu olgularda IL-39 ekspresyonu ile ilgili herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada, IL-39'un akut ve kronik bruselloz hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre daha düşük seviyede eksprese olduğu görülmüştür. Bu durum *Brucella* enfeksiyonunun pro-enflamatuvar özellikte olan IL-36 ile benzer biçimde IL-39 ekspresyonunu da baskıladığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak, hem pro-enflamatuvar (IL-36, IL-39) hem de anti-enflamatuvar (IL-35, IL-37, IL-38) özellikte olduğu kabul edilen yeni sitokinlerin serum düzeylerinin, hasta gruplarında sağlıklı kontrollere oranla azaldığı görülmüştür. Bu durum *Brucella* bakterisinin bu sitokin gruplarının ekspresyonunu baskıladığını düşündürmektedir. Sepsis'de (Matsumoto ve ark., 2018) ve tüberküloz (Basingnaa ve ark., 2018) gibi bazı enfeksiyon hastalıklarında görülen anti-enflamatuvar sitokinler ile pro-enflamatuvar sitokinler arasında pozitif korelasyona benzer biçimde hasta grubunda sağlıklı kontrole göre anti-enflamatuvar sitokinlerin azalmasına karşılık pro-enflamatuvar sitokinlerin de azaldığı, kronik vakalarda ise akut vakalara oranla hem pro-enflamatuvar hem de anti-enflamatuvar sitokinlerin arttığı gözlenmiştir. Anti-enflamatuvar sitokinlerden IL-35 ve IL-37 akut hastalara kıyasla kronik hasta gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur. Anti-enflamatuvar bu sitokinlerin kronik vakalarda artmış olması kronikleşmede önemli rol oynadıklarını düşündürmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abbas AK, Lichtman AH (2007) Temel İmmünoloji: İmmün sistemin işlev ve bozuklukları. Çeviren: Camcıoğlu Y, Deniz G, 1.baskı, Medikal Yayıncılık, İstanbul, s: 1-363.

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (2000) Cellular and molecular immunology. Third edition, WB Saunders Company, Philadelphia, pp:3-335.

Ahsan F, Moura-Alves P, Guhlich-Bornhof U et al (2016) Role of Interleukin 36 γ in Host Defense Against Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases* 214:464–74.

Akbulut HH, Kilic SS, Bulut V et al (2005) Determination of intracellular cytokines produced by Th1 and Th2 cells using flow cytometry in patients with brucellosis. *Immunology and Medical Microbiology* 45:253-8.

Akdis M, Akdis CA (2014) Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol* 133:621-31.

Akdis M, Burgler S, Cramer R et al (2011) Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 127:701-21, e1-70.

Aktug Demir N, (2009) Brusellozda Hücresel İmmün Yanıtın Araştırılması (Uzmanlık Tezi): T.C. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi.

Al Dahouk S, Fleche PL, Nockler K (2007) Evaluation of Brucella MLVA typing for human brucellosis. *J Microbiol Methods* 69:137-45.

Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K et al (2003) Laboratory-based diagnosis of brucellosis: a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. *Clin Lab* 49:577-89.

Alp E, Koc RK, Durak AC et al. Doxycycline plus streptomycin versus ciprofloxacin plus rifampicin in spinal brucellosis. *BMC Infect. Dis.* 2006; 6:72.

Andreas FH, Kamila KM, Markus FFA et al (2010) Importance of Lipopolysaccharide and Cyclic β -1,2-Glucans in Brucella-Mammalian Infections. *International Journal of Microbiology* DOI:10.1155/2010/124509.

- Angulo FJ, Swerdlow DL (1995) Bacterial enteric infections in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 21(1):84.
- Aparicio-Siegmund S, Gerbers C (2015) The biology of interleukin-27 reveals unique pro and anti-inflammatory functions in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 26:579–586.
- Arend WP (2002) The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:323–40.
- Ariza J, Pigrau C, Canas C et al (2001) Current understanding and management of chronic hepatosplenic suppurative brucellosis. *Clin Infect Dis* 32:1024-33.
- Aygen B, Doganay M, (2003) Human brucellosis: an overview. *Int J Infect Dis* 7:173-82.
- Aygen B, Doganay M, Sumerkan B et al (2002) Clinical manifestations, complications and treatment of brucellosis: an evaluation of 480 patients. *Med Mal Infect* 32:485-93.
- Aygen B, Sumerkan B, Yildiz O et al (2001) An unusual manifestation of brucellosis: a case with multisystemic involvement and adult respiratory distress syndrome. *Probl Infect Parasitic Dis* 29:10-1.
- Baldwin CL, Goenka R (2006) Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection. *Crit Rev Immunol* 26:407–442.
- Bannatyne RM, Jackson MC, Memish Z (1997) Rapid diagnosis of *Brucella* bacteremia by using the BACTEC 9240 system. *J Clin Microbiol* 35:2673-4.
- Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS et al (2007) *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One* 2(7):e631.
- Barrionuevo P, Delpino MV, Pozner RG et al (2013) *Brucella abortus* induces intracellular retention of MHC-I molecules in human macrophages down-modulating cytotoxic CD8+T cell responses. *Cell Microbiol* 15:487–502.
- Basingnaa A, Antwi-Baffour S, Nkansah DO et al (2018) Plasma Levels of Cytokines (IL-10, IFN- γ and TNF- α) in Multidrug Resistant Tuberculosis and Drug Responsive Tuberculosis Patients in Ghana. *Diseases* 7:2.
- Belladonna ML, Grohmann U (2013) Bioengineering heterodimeric cytokines: Turning promiscuous proteins into therapeutic agents. *Biotechnol. Genet Eng Rev* 29:149–174.
- Bendelac A, Lantz O, Quimby ME et al (1995) CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 268:863.

Bensen JT, Dawson PA, Mychaleckyj JC et al (2001) Identification of a novel human cytokine gene in the interleukin gene cluster on chromosome 2q12-14. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 11:899–904.

Berguer PM, Mundinano J, Piazzon I et al (2006) A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4. *J Immunol* 176: 2366-2372.

Bertotto A, Gerli R, Spinozzi F et al (1993) Lymphocytes bearing the $\gamma\delta$ T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection. *Eur J Immunol* 23(5):1177.

Bilgehan H (2002) *Brucella*, Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Barış Yayınları, İzmir, s:159-169; 184–198; 279-358.

Billard E, Cazevieille C, Dornand J et al (2005) High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Infect Immun* 73: 8418–8424.

Billard E, Dornand J, Gross A (2007) *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. *Infect Immun* 75:4980–4989.

Blumberg H, Dinh H, Trueblood ES et al (2007) Opposing activities of two novel members of the IL-1 ligand family regulate skin inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 204:2603–2614.

Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V et al. (2002) Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet Microbiol* 90:341-8.

Boutet MA, Bart G, Penhoat M et al (2016) Distinct expression of interleukin (IL)-36 α , β and γ , their antagonist IL-36Ra and IL-38 in psoriasis, rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 184:159–73.

Bowden RA, Estein SM, Zygmunt MS et al (2000) Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microbes Infect* 2:481-486.

Brandão AP, Oliveira FS, Carvalho NB et al (2012) Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN-gamma knockout than IL-12/beta2-microglobulin doubledeficient mice. *Clin Dev Immunol* 589494.

Brandao AP, Oliveira FS, Carvalho NB et al. (2012). Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN-gamma knockout than IL-12/beta2-microglobulin doubledeficient mice. *Clin Dev Immunol* 589494.

Bricker BJ, Ewalt DR, Halling SM (2003) *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol* 3:15.

Bridgewood C, Alase A, Watad A et al (2019) The IL-23p19/EBI3 heterodimeric cytokine termed IL-39 remains a theoretical cytokine in man. *Inflamm Res* 68(6): 423–426.

Bronner DN, O’Riordan MX, He Y (2013) Caspase-2 mediates a *Brucella abortus* RB51-induced hybrid cell death having features of apoptosis and pyroptosis. *Front Cell Infect Microbiol* 3:83.

Bulau AM et al (2014) Role of caspase-1 in nuclear translocation of IL-37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci* 111:2650–5.

Busfield SJ et al (2000) Identification and gene organization of three novel members of the IL-1 family on human chromosome 2. *Genomics* 66:213–6.

Carbel MJ, (2006) *Brucellosis in human and animals*. WHO/CDS/EPR/7, ISBN: 92 41547138.

Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V et al (2006) *Brucella spp* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories* 5:13.

Carrier Y, Ma HL, Ramon HE et al (2011) Interregulation of Th17 cytokines and the IL-36 cytokines in vitro and in vivo: Implications in psoriasis pathogenesis. *The Journal of investigative dermatology* 131:2428–2437.

Chao-yan Yue, Bin Zhang, Chun-mei Ying (2015) Elevated Serum Level of IL-35 Associated with the Maintenance of Maternal-Fetal Immune Tolerance in Normal Pregnancy. *PLoS One* 10(6): e0128219.

Chen Y, Wang CJ, Lin SH (2016) Interleukin-35 is upregulated in response to influenza virus infection and secondary bacterial pneumonia. *Cytokine* 81:23–27.

Choi J, Leung PS, Bowlus C et al (2015) IL-35 and Autoimmunity: A Comprehensive Perspective. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 49:327–332.

Christianson CA, Goplen NP, Zafar I et al (2015) Persistence of asthma requires multiple feedback circuits involving type 2 innate lymphoid cells and IL-33. *J Allergy Clin Immunol* 136:59-68.e14.

Chustz RT, Nagarkar DR, Poposki JA (2011) Regulation and function of the IL-1 family cytokine IL-1F9 in human bronchial epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 45:145–153.

Cloekaert A, Vizcaino N, Paquet JY (2002) Major outer membrane proteins of *Brucella spp*: past, present and future. *Vet Microbiol* 90: 229-232.

- Collins HL, Kaufmann SH (2001) The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology* 103:1-9.
- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566–569.
- Conde-Alvarez R, Arce-Gorvel V, Iriarte M et al (2012) The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition. *PLoS Pathog* 8:e1002675.
- Corbel MJ, (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 3:213-21.
- Cui M, Wang T, Xu J et al (2013) Impact of Hfq on global gene expression and intracellular survival in *Brucella melitensis*. *PLoS ONE* 8:e71933.
- De Almeida LA, Macedo GC, Marinho FA et al (2013) Toll-like receptor 6 plays an important role in host innate resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect Immun* 81:1654-1662.
- Delpino MV, Barrionuevo P, Scian R (2010) *Brucella*-infected hepatocytes mediate potentially tissue damaging immune responses. *J Hepatol* 53:145-54.
- DelVecchio VG, Kapatral V, Elzer P et al (2002) The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol* 90:587-92.
- Demirkan F, Akalin HE, Simsek H et al (1993) Spontaneous peritonitis due to *Brucella melitensis* in a patient with cirrhosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12:66-7.
- Densen P (2000) Complement. Editors: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, Principles and practice of infectious diseases. 6 th edition, Churchill- Livingstone, Philadelphia, pp: 69-89.
- Devergne O, Hummel M, Koeppen H et al (1996) A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J. Virol.* 70:1143–1153.
- Diacovich L, Gorvel JP (2010) Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nat Rev Microbiol* 8(2):117-28.
- Dieli F, Ivanyi J, Marsh P et al (2003) Characterization of lung gamma delta T cells following intranasal infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin. *J Immunol* 170:463-9.
- Dinarello C, Arend W, Sims J (2010) IL-1 family nomenclature. *Nature Immunology* 11:973.
- Dinarello CA, Bufler P. (2013) Interleukin-37. *Semin. Immunol.* 25:466–8.

Du WX, He Y, Jiang, HY et al (2016) Interleukin 35: A novel candidate biomarker to diagnose early onset sepsis in neonates. *Clin Chim Acta* 462:90–95.

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.

Egwuagu CE, Yu CR, Sun L et al (2015) Interleukin 35: critical regulator of immunity and lymphocyte-mediated diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 26:587–93.

Elfaki MG, Al-Hokail AA (2009) Transforming growth factor beta production correlates with depressed lymphocytes function in humans with chronic brucellosis. *Microbes Infect* 11:1089–1096.

Fairbairn IP (2004) Macrophage apoptosis in host immunity to mycobacterial infections. *Biochem Soc Trans* 32: 496-8.

Feldman M (1993) Cell Cooperation in the antibody response. Editors: Roitt I, Brostoff J, Male D, Immunology. 4 th edition, Year Book Europe Limited, London, pp:1-7.

Forestier C, Deleuil F, Lapaque N et al (2000) *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J Immunol* 165: 5202–5210.

Franco MP, Mulder M, Gilman RH et al (2007) Human brucellosis. *Lancet Infect Dis.* 7(12):775–786.

Franzke CW, Cobzaru C, Triantafyllopoulou A (2012) Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating egfr ligand dependent terminal keratinocyte differentiation. *The Journal of experimental medicine* 209:1105–1119.

Frey S, Derer A, Messbacher ME (2013) The novel cytokine interleukin-36 α is expressed in psoriatic and rheumatoid arthritis synovium/psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 72:1569–1574.

Friedrich M, Tillack C, Wollenberg A et al (2014) IL-36 gamma sustains a proinflammatory self-amplifying loop with IL-17c in anti-TNF-induced psoriasiform skin lesions of patients with crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 20:1891–1901.

Fujita H, Inoue Y, Seto K (2012) Interleukin-37 is elevated in subjects with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 69:173–5.

Galanakis E, Makis CA, Hatzimichael CE (2005) Serum levels of interleukin-2 receptor alpha as a predictor of outcome in Brucellosis. *Journal of Infection* 51:206-10.

Garin B, Blasco JM, Marin C et al (2005) The diagnosis of brucellosis in sheep and

goats, old and new tools. 6th International Sheep Veterinary Congress, Crete, Greece.

Gaviria-Ruiz MM, Cardona-Castro NM (1995) Evaluation and comparison of different blood culture techniques for bacteriological isolation of *Salmonella typhi* and *Brucella abortus*. J Clin Microbiol 33:868-71.

Gentilini MV, Velasquez LN, Barrionuevo P et al (2015) Adrenal steroids modulate the immune response during *Brucella abortus* infection by a mechanism that depends on the regulation of cytokine production. Infect Immun 83:1973–1982.

Giambartolomei GH, Zwerdling A, Cassataro J et al (2004) Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. J Immunol 173: 4635-4642.

Gill HS, Watson DL, Brandon MR (1992) In vivo inhibition by a monoclonal antibody to CD4+ T cells of humoral and cellular immunity in sheep. Immunology 77(1):38.

Glickman MS, Pamer EG (2000) Cell-mediated defense against infection. Editors: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, Principles and Practice of Infectious Diseases. 6 th edition, Churchill- Livingstone, Philadelphia, pp: 117-135.

Godfroid J, Scholz HC, Barbier T et al (2011) Brucellosis at the animal ecosystem human interface at the beginning of the 21st century. Preventive Veterinary Medicine 102: 118-131.

Goenka R, Parent MA, Elzer PH et al (2011). B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus*. J infect Dis 203:1136–1146.).

Gorvel JP, Moreno E (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet Microbiol 90:281-97.

Gotuzzo E, Celillo C (1992) Brucella. Editors: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, Jovanovich HB, Infectious Diseases. Third edition, LWW, Philadelphia, pp: 1513–1518.

Grossi C, Lydyard P (1993) Cells Involved In Immune Responses. Editors: Roitt I, Brostoff J, Male D, Immunology. 4 th edition, Mosby Year Book Europe Limited, St. Louis, Missouri, pp: (2) 2-20.

Hadjinikolau L, Triposkiadis S, Zairis M et al (2001) Successful management of *Brucella melitensis* endocarditis with combined medical and surgical approach. Eur J Cardiothorac Surg 19:806-10.

Hasanjani-Roushan MR, Soleimani-Amin MJ, Abdoel TH et al (2005) Application of a rapid and simple *Brucella*-specific IgM and IgG antibody test for the serodiagnosis of brucellosis in a hospital in Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg 99:744-50.

Hasegawa, H, Mizoguchi I, Chiba Y et al (2016) Expanding Diversity in Molecular Structures and Functions of the IL-6/IL-12 Heterodimeric Cytokine Family. *Front Immunol* 7:479.

Hayat L, (2000) Doksisiklin-rifampisin ve levamizol kombinasyonunun kronik brusellozlu hastaların lenfosit alt grupları ve fagositik hücre fonksiyonları üzerine etkisi (Uzmanlık Tezi): T.C. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi.

He YQ, Reichow S, Ramamoorthy S et al (2006) *Brucella melitensis* triggers time-dependent modulation of a apoptosis and down-regulation of mitochondrion-associated gene expression in mouse macrophages. *Infect Immun* 74:5035–5046.

Hong-Juan W, Yan-Fang J, Xin-Rui W et al (2016) Elevated serum interleukin-38 level at baseline predicts virological response in telbivudine-treated patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 22(18): 4529-4537.

Højen JF, Rasmussen TA, Andersen KL et al (2015) Interleukin-37 Expression Is Increased in Chronic HIV-1-Infected Individuals and Is Associated with Inflammation and the Size of the Total Viral Reservoir. *Mol Med* 21: 337-345.

Huang LY, Krieg AM, Eller N (1999) Induction and regulation of Th1-inducing cytokines by bacterial DNA, lipopolysaccharide and heat-inactivated bacteria. *Infect Immun* 67(12):6257.

Huang Z, Gao C, Chi X et al (2015) IL-37 Expression is Upregulated in Patients with Tuberculosis and Induces Macrophages Towards an M2-like Phenotype. *The Foundation for the Scandinavian Journal of Immunology* DOI: 10.1111/sji.12326.

Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T et al (2013) Epithelial expression of interleukin-37b in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Immunology* vol. 172(3): 410–416.

Irmak H, Buzgan T, Evirgen O (2004) Use of a new, simple and rapid diagnostic test, the *Brucella*-IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an endemic area in eastern Turkey. *Am J Trop Med Hyg* 70:688-94.

Iwasaki A, Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5(10):987-95.

Janeway CA, Traves P (1996) *Immuno Biology*. 2th Edition, Garland Publishing, London, pp:18-52.

Jiang X, Baldwin CL (1993) Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 61: 124–134.

Jimenez de Bagues MP, Ouahrani-Bettache S, Quintana JF et al. (2010) The new species *Brucella microti* replicates in macrophages and causes death in murine models

of infection. *J Infect Dis* 202:3.

Kapsenberg ML (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3:984–993.

Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ (2007) Discovery and biology of IL23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 25:242.

Kawai T, Akira S (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* 13: 816-825.

Kılıçturgay K (2003) İmmünoloji. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, s:1-160.

Kittelberger R, Diack DS, Vizcaino N et al (1998) Characterization of an immunodominant antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol* 59:213-215.

Kumar S, McDonnell PC, Lehr R et al (2000) Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. *The Journal of Biological Chemistry* 275(14):10308–10314.

Lapaque N, Takeuchi O, Corrales F et al (2006) Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol* 8:401–413.

Lapham C, Golding B, Inman J et al (1996) *Brucella abortus* conjugated with a peptide derived from the V3 loop of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 induces HIV-specific cytotoxic T-cell responses in normal and in CD4+ cell-depleted BALB/c mice. *J Vir* 70(5):3084.

Le Fleche P, Jacques I, Grayon M et al. (2006) Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol* 6:9.

Lee DJ, Abeyratne A, Carson DA et al (1998) Induction of an antigen-specific, CD1restricted cytotoxic T lymphocyte response in vivo. *J Exp Med* 187(3):433.

Lee J, Choi K, Olin MR et al (2004) Gammadelta T cells in immunity induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vaccination. *Infect Immun* 72:1504–11.

Li X, Mai J, Virtue A et al (2012) IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine: A new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS ONE* 7(3): e33628.

Lin H, Ho AS, Haley-Vicente D et al (2001) Cloning and characterization of IL-1HY2, a novel interleukin-1 family member. *The Journal of Biological Chemistry* 23:20597–20602.

- Liu CH, Liu CJ, Su TH (2017) Hepatitis B virus Reactivation in Patients Receiving Interferon-free Direct-Acting Antiviral Agents for Chronic Hepatitis C virus Infection. *Open Forum Infect Dis* DOI: 10.1093/ofid/ofx028.
- Lloyd CM, Saglani S (2013) T cells in asthma: influences of genetics, environment, and T-cell plasticity. *J Allergy Clin Immunol* 131:1267-74.
- Lopez-Goni I, Guzman-Verri C, Manterola L (2002) Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrRiBvrS. *Vet Microbiol* 90:329-39.
- Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM et al (2003) Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. *J Med Microbiol* 52:883-7.
- Lunding L, Webering S, Vock C et al (2015) IL-37 requires IL-18R α and SIGIRR/IL-1R8 to diminish allergic airway inflammation in mice. *Allergy* 70(4):366–373.
- Luo Y et al (2013) IL-37, an inhibitor of innate and adaptive immunity, is elevated in the blood of melanoma patients. *Pigment Cell Melanoma Res* 26:951.
- Lutz MB, Schuler G (2002) Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23:445–449.
- Macedo GC, Magnani DM, Carvalho NB et al (2008) Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *J Immunol* 180:1080-1087.
- Mantecon MA, Gutierrez P, del Pilar Zarzosa M et al. (2006) Utility of an immunocapture-agglutination test and an enzyme-linked immunosorbent assay test against cytosolic proteins from *Brucella melitensis* B115 in the diagnosis and follow-up of human acute brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 55:27-35.
- Mantur BG, Amarnath SK, Shinde RS (2007) Review of clinical and laboratory features of human Brucellosis. *Indian Journal of Medical Microbiology* 25:188-202.
- Mao H, Gao W, Ma C et al (2013) Human placental trophoblasts express the immunosuppressive cytokine IL-35. *Hum Immunol* 74:872–877.
- Maquart M, Zygmunt MS, Cloeckaert A (2009) Marine mammal *Brucella* isolates with different genomic characteristics display a differential response when infecting human macrophages in culture. *Microbes Infect* 11:361–366.
- Martirosyan A, Moreno E, Gorvel JP (2011) An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunol Rev* 240:211–234.
- Matsumoto H, Ogura H, Shimizu K et al (2018) The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Scientific Reports* 8:13995.

McLean DR, Russel N, Khan MY (1992) Neurobrucellosis: clinical and therapeutic features. *Clin Infect Dis* 15:582-90.

McNamee EN et al (2011) Interleukin 37 expression protects mice from colitis. *Proc Natl Acad Sci* 108:16711–6117.

Memish Z (2001) Brucellosis control in Saudi Arabia: prospects and challenges. *J Chemoter* 13:11-7.

Milora KA, Uppalapati SR, Sanmiguel JC et al (2017) Interleukin-36 β provides protection against HSV-1 infection, but does not modulate initiation of adaptive immune responses. *Scientific Reports* 7: 5799.

Monack DM, Mueller A, Falkow S (2004) Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol* 2:747–765.

Moretti S, Bozza S, Oikonomou V et al IL-37 inhibits inflammasome activation and disease severity in murine aspergillosis. *PLoS Pathogens* 10:11.

Moschen AR et al (2011) Adipose and liver expression of interleukin (IL)-1 family members in morbid obesity and effects of weight loss. *Mol Med* 17:840–5.

Naroeni A, Porte F (2002) Role of cholesterol and gangliosid GM (1) in entry and short term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun* 70:1640-4.

Ning X, Jian Z, Wang W (2015) Low Serum Levels of Interleukin 35 in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Tohoku J Exp Med* 237:77–82.

Nishida A, Hidaka K, Kanda T et al (2016) Increased expression of interleukin-36, a member of the interleukin-1 cytokine family, in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 22:303–314.

Nockler K, Scholz HC, Tomaso H (2006) Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of *Brucella* infections. *J Immunol Methods* 309:34-47.

Nold MF et al (2010) IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol* 11:1014–22.

Novick D et al (1999) Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 10:127–36.

Oliveira SC, de Oliveira FS, Macedo GC et al (2008) The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: Toll-like receptors and beyond. *Microbes Infect* 10: 1005-1009.

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD et al (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation

between toll-like receptors. *Proc Natl Acad* 97:13766-13771.

Ozturk R, Mert A, Kocak F et al. (2002) The diagnosis of brucellosis by use of BACTEC 9240 blood culture system. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44:133-5.

Pasquali P, Thornton AM, Vendetti S et al (2010) CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells limit effector T cells and favor the progression of brucellosis in BALB/c mice. *Microbes Infect* 12:3–10.

Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM et al (2011) An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PLoS ONE* 6(1):e16203.

Pei, J., Kahl-McDonagh, M., and Ficht, T. A. (2014). *Brucella* dissociation is essential for macrophage egress and bacterial dissemination. *Front. Cell Infect Microbiol.* 4:23. doi: 10.3389/fcimb.2014.00023.

Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP (2000) Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microb Infect* 2:829-35.

Poizot-Martin I, et al (2013) Lack of correlation between the size of HIV proviral DNA reservoir and the level of immune activation in HIV-infected patients with a sustained undetectable HIV viral load for 10 years. *J Clin Virol* 57:351–5.

Queipo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P (1997) Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J Clin Microbiol* 35:2927-30.

Raia A (2004) Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 120: 213-32.

Ramnath D, Tunny K, Hohenhaus DM et al (2015) TLR3 drives IRF6- dependent IL-23p19 expression and p19/EBI3 heterodimer formation in keratinocytes. *Immunol Cell Biol* 93:771.

Rudloff I, Godsell J, Nold-Petry CA et al (2015) Brief report: interleukin-38 exerts antiinflammatory functions and is associated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 67:3219–25.

Ruiz-Mesa JD, Sanchez-Gonzalez J, Reguera JM et al (2005) Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the diagnosis of human brucellosis in emergency department in endemic areas. *Clin Microbiol Infect* 11:221-5.

Salcedo SP, Marchesini MI, Lelouard H et al. (2008) *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog* 4: e21.

Sanchez PR, Hernandez PN, Martines AJ et al (2017) Interleukin 35 polymorphisms are associated with decreased risk of premature coronary artery disease, metabolic parameters and IL-35 levels: The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Study. *Mediat Inflamm* ID:6012795.

Sawant DV, Hamilton K, Vignali DAA (2015) Interleukin-35: Expanding Its Job Profile. *J Interferon Cytokine Res* 35:499–512.

Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ (2002) Brucellosis Vaccines: Past, Present and Future. *Veterinary Microbiology* 90: 479-496.

Scian R, Barrionuevo P, Rodriguez A et al (2013) *Brucella abortus* invasion of synoviocytes inhibits apoptosis and induces bone resorption through RANKL expression. *Infect Immun* 81:1940–1951.

Segueni N, Vigne S, Palmer G et al (2015) Limited contribution of IL-36 versus IL-1 and TNF pathways in host response to mycobacterial infection. *PloS one* 10: e0126058.

Seki S, Habu Y, Kawamura T et al (2000) The liver as a crucial organ in the first line of host defense: The roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 ag⁺T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol Rev* 174:35.

Serra J, Vinas M (2004) Laboratory diagnosis of brucellosis in a rural endemic area in northeastern Spain. *Int Microbiol* 7:53-8.

Sha X, Meng S, Li X et al (2015) Interleukin-35 Inhibits Endothelial Cell Activation by Suppressing MAPK-AP-1 Pathway. *J Biol Chem* 290:19307–19318.

Sharma S et al (2008) The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. *J Immunol* 180:5477–82.

Sheng-Tao C, Ding Y, Yi L (2018) Interleukin-35 Level Is Reduced in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci* 15(2): 188–194.

Skendros P, Boura P (2013) Immunity to brucellosis. *Rev Sci Tech.* 32(1):137-47.

Smith CM, Wilson NS, Waithman J et al et al (2004) Cognate CD4⁺T cell licensing of dendritic cells in CD8⁺ T cell immunity. *Nat Immunol* 5:1143–1148.

Smith DE et al (2000) Four new members expand the interleukin-1 superfamily. *J Biol Chem* 275:1169–75.

Song L et al (2012) Glucocorticoid regulates interleukin-37 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 33:111–7.

Song L, Qiu F, Fan Y et al (2013) Glucocorticoid regulates interleukin-37 in systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Immunology* 33(1): 111–117.

Song M, Ma X (2016) The Immunobiology of IL-35 and its Regulation and Gene Expression. *Adv Exp Med Biol* 941:213–225.

Spera JM, Ugalde JE, Mucci J et al (2006) A B lymphocyte mitogen is a *Brucella*

abortus virulence factor required for persistent infection. Proc Natl Acad Sci 103: 16514–16519).

Starr T, Child R, Wehrly TD et al (2012) Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. Cell Host Microbe 11(1):33-45.

Sun L, He C, Nair L et al (2015) Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. Cytokine 75:249–55.

Sümerkan B (2008) *Brucella* türleri. Editörler: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, cilt 2, Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul, s:897-908.

Taylor SL, Renshaw BR, Garka KE et al (2002) Genomic organization of the interleukin-1 locus. Genomics 79:726–33.

Towne JE et al (2011) Interleukin-36 (IL-36) ligands require processing for full agonist (IL-36 α , IL-36 β , and IL-36 γ) or antagonist (IL-36Ra) activity. J Biol Chem 286:42594–602.

Towne JE, Sims JE (2012) Il-36 in psoriasis. Current opinion in pharmacology 12:486–490.

Trujillo IZ, Zavala AN, Caceres JG et al (1994) Brucellosis. Infect Dis Clin North Am 8:225-41.

Türkçapar N, Kurt H (2002) Bruselloz. Editörler: Uzun Ö, Ünal S, Güncel Bilgiler Işığında Enfeksiyon Hastalıkları, 2. cilt, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, s:1015-1024.

Ushach I (2015) Functional characterization of IL-39, a novel cytokine produced by macrophages and barrier tissues. University of California, Irvine, <https://escholarship.org/uc/item/1775x7fp>.

van de Veerdonk FL, Netea MG (2013) New insights in the immunobiology of IL-1 family members. Frontiers in immunology 4:167.

van de Veerdonk FL, Stoeckman AK, Wu G et al (2012) IL-38 binds to the IL-36 receptor and has biological effects on immune cells similar to IL-36 receptor antagonist. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 8:3001–3005.

Velasquez LN, Delpino MV, Ibanez AE et al (2012) *Brucella abortus* induces apoptosis of human T lymphocytes. Microbes Infect 14:639–650.

Vignali DA, Kuchroo VK (2012) IL-12 family cytokines: immunological playmakers. Nat Immunol 13:722–8.

Villarino AV, Huan E, Hunter CA (2004) Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. *J Immunol* 173:715–720.

Vizcaino N, Caro-Hernandez P, Cloeckeaert A et al (2004) DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella spp*: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis* related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. *Microbes Infect* 6:821-34.

Vizcaino N, Kittelberger R, Cloeckeaert A et al (2001) Minor nucleotide substitutions in the omp31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. *Infect Immun* 69:7020-7024.

Wang W, Wu J, Qiao J et al (2014) Evaluation of humoral and cellular immune responses to BP26 and OMP31 epitopes in the attenuated *Brucella melitensis* vaccinated sheep. *Vaccine* 32(7):825-833.

Wang X, Wei Y, Xiao H et al (2016) A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in lupus-like mice. *Eur J Immunol* 46:1343–50.

Watarai M, Makino S, Fujii Y et al (2002) Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* 4:341-55.

Wei P, Cui G, Lu Q et al (2015) A20 promotes *Brucella* intracellular growth via inhibition of macrophage cell death and activation. *Vet Microbiol* 175:50–57.

Whatmore AM, Shankster SJ, Perrett LL et al (2006) Identification and characterization of variable-number tandemrepeat markers for typing of *Brucella spp*. *J Clin Microbiol* 44:198293.

Wuyts A, Proost P, Damme JV (1998) Interleukin-8 and other CXC Chemokines. Editor: Thomson A, *The cytokine handbook*. 3rd edition, Academic Press, USA, pp: 271-313.

Xinyuan L, Pu F, William YY et al (2017) IL-35, as a newly proposed homeostasis-associated molecular pattern, plays three major functions including anti-inflammatory initiator, effector and blocker in cardiovascular diseases. *Cytokine* 6: 003.

Yan C, Zhang BB, Hua H et al (2015) The dynamics of Treg/Th17 and the imbalance of Treg/Th17 in *Clonorchis sinensis*-infected mice. *PLoS ONE* 10(11): e0143217.

Ye L, Ji L, Wen Z et al (2014) IL-37 inhibits the production of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: Its correlation with disease activity. *Journal of Translational Medicine* 12(1):69.

Ye L, Jiang B, Deng J et al (2015) IL-37 alleviates rheumatoid arthritis by suppressing IL-17 and IL-17-triggering cytokine production and limiting Th17 cell proliferation.

The Journal of Immunology 194(11):5110–5119.

Young EJ (1997) Brucellosis. Editors: Emmerson AM, Hawkey PM, Gillespie SH, eds. Principals and practice of clinical bacteriology. Wiley, Chichester, pp:337-48.

Young EJ (2000) *Brucella* species. Editors: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th edition, Elsevier Churchill-Livingstone, Philadelphia, pp:2386-93.

Young EJ (2005) *Brucella* species. Editors: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Principles and Practice of Infectious Diseases. Third edition, Churchill Livingstone, Philadelphia, pp:2669-2674.

Young EJ (2010) *Brucella* Species. Editors: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, Principles and Practice of Infectious Disease. Seventh edition, Churchill Livingstone, Philadelphia, pp: 2921-25.

Young EJ, Tarry A, Genta RM et al (2000) Thrombocytopenic purpura associated with brucellosis: report of 2 cases and literature review. Clin Infect Dis 31:904-9.

Zhan Y, Kelso A, Cheers C (1995) Differential activation of *Brucella*-reactive CD4+ T cells by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts, Infect Immun 63(3):969-75.

Zhang LJ, Guo HY, Zhang DQ et al (2017) Analysis of serum interleukin-27 and interleukin-35 concentrations inpatients with Guillain-Barré syndrome. Clinica Chimica Acta 468:5-9.

Zhao PW, Jiang W, Wang L et al (2014) Plasma levels of IL-37 and correlation with TNF- α , IL-17A, and Disease activity during DMARD treatment of rheumatoid arthritis. PLoS ONE ID number: e95346.

Zwerdling A, Delpino MV, Barrionuevo P et al (2008) *Brucella* lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by *Brucella abortus*. Microbes Infect 10: 1346–1354.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

- ADCC:** Antikor bağımlı hücresel sitotoksosite
- AP-1:** Aktive edici protein-1
- ASH:** Antijen sunan hücre
- BCV:** *Brucella* içeren vakuol
- BOS:** Beyin omurilik sıvısı
- BvrR/BvrS:** *Brucella* virülans ilişkili regülatör/sensör protein
- CCL20:** Kemokin ligandı 20
- CD:** Farklılaşma kümesi
- Cdc42:** Hücre bölünmesi kontrol proteini 42
- CFU:** Koloni oluşturan üniteler
- CO₂:** Karbondioksit
- CRP:** C-Reaktif protein
- C_T:** Cycle treshold
- DH:** Dendritik hücre
- DMP:** Dış membran proteini
- DNA:** Deoksiribonükleik asit
- ELISA:** Enzim bağılı immünosorban yöntem
- ER:** Endoplazmik retikulum
- FPA:** Fluorescence polarization assay
- GTPaz:** Guanozintrifosfataz
- HIV:** İnsan immünyetmezlik virüsü
- H₂S:** Hidrojen sülfür
- HRP:** Horse radish peroxidase
- IBD:** Enflamatuvar bağırsak hastalığı
- IFN:** İnterferon
- Ig:** İmmünglobulin
- IL:** İnterlökin

ILC: Doğal lenfoid hücre
IRF: İnterferon düzenleyici faktör
KC: Keratinosit
KDa: Kilo Dalton
LFA: Lateral flow assay
LPS: Lipopolisakkarit
MAIT: Mukoza-ilişkili değişmez T
MAPK: Mitojen aktive edici protein kinaz
MCP-1: Monosit kemoatraktan protein-1
MHC: Majör histokompatibilite kompleksi
MIP-1: Makrofaj enflamatuvar protein-1
mL: Mililitre
MÖ: Milattan önce
MyD88: Myeloid farklılaşma birincil yanıtı 88
NF-κB: Nükleer faktör kappa B
ng/L: Nanogram/Litre
NK: Doğal öldürücü
NO: Nitrik oksit
PAMP: Patojen ilişkili moleküler patern
pg/mL: Pikogram/Litre
PKMH: Periferik kan mononükleer hücresi
PrpA: Prolin rasmaz
PRR: Patern tanıyıcı reseptör
RA: Romatoid artrit
Rac: Ras ilişkili C3 Botulinum toksin substratı
Rho: Ras homolog gen ailesi
RNA: Ribonükleik asit
ROI: Reaktif oksijen araürünleri
ROS: Reaktif oksijen türleri
rpm: Her dakikadaki devir
RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SDS: Sodyum dodesil sülfat

SLE: Sistemik lupus eritomatozus

STL: Sitotoksik T lenfosit

Teff: T efektör hücre

TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü-beta

Th: T helper (yardımcı)

TLR: Toll-benzeri reseptör

TNF: Tümör nekroz faktör

Treg: T regülatör hücre

WHO: Dünya sağlık örgütü

μ l: Mikrolitre

μ m: Mikrometre

$^{\circ}$ C: Santigrad derece

8. TEŞEKKÜR

İmmünoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimi aldığım süre boyunca sürekli desteği ile yanımda olan bilgi, görgü ve tecrübelerine her zaman başvurduğum İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Barbaros ORAL hocama; bana her açıdan yol gösteren, desteklerini esirgemeyen, bilimsel görgülerini ve kişiliğini hep örnek aldığım, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum hoşgörülü danışmanım Prof. Dr. Ferah BUDAK hocama; çalışmanın her aşamasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, hep destek olan, motivasyonumu arttıran Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Halis AKALIN hocama; bir üyesi olmaktan gurur duyduğum herbirinden ayrı ayrı çok büyük destekler gördüğüm, bilgilerini cömertçe paylaşan, özveri ile çalışan İmmünoloji Anabilim Dalı'nın değerli çalışanları Figen AYMAK ve Deniz GÜLKAYA'ya; çalışmalarımnda manevi desteği olan ve birlikte çalışmaktan çok mutlu olduğum sevgili çalışma arkadaşım Mehrdad PASHAZADEH'ye; beni bugünlere getiren aileme; tez çalışmamda büyük destek sağlayan sevgili kardeşim Enver HIZ'a ve hayatımı anlamlı kılan sabrı ve sevgisiyle her zaman yanımda olan, beni destekleyen, motive eden eşim Uzm. Dr. Azer ELLERGEZEN'e; bana desteğini esirgemeyen herkese teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir (Destek No: DDP(T)-2017/13).

9. ÖZGEÇMİŞ

1 Temmuz 1987 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğretim ve orta öğrenimini Adnan Ötügen İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini Çemberlitaş Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2005 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2010 yılında mezun olduktan sonra 2013 yılında aynı üniversitenin Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansını tamamladı. 2014 yılında doktora eğitimine başladığı Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji (İmmünoloji) Anabilim Dalı'na 2015 yılında Araştırma Görevlisi olarak atandı, halen bu görevine devam etmektedir. Evli ve Bursa'da ikamet etmektedir.