CEREN ESEN

İMMÜNOLOJİ ANA BİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2025

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

BRUCELLA İLE ENFEKTE EDİLMİŞ VEYA İNAKTİF *BRUCELLA*'YA MARUZ BIRAKILMIŞ MAKROFAJLARDAN KÖKEN ALAN EKSOZOMLARIN KARAKTERİZASYONU VE MAKROFAJ POLARİZASYONUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

CEREN ESEN

(YÜKSEK LİSANS)

BURSA-2025

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

BRUCELLA İLE ENFEKTE EDİLMİŞ VEYA İNAKTİF *BRUCELLA*'YA MARUZ BIRAKILMIŞ MAKROFAJLARDAN KÖKEN ALAN EKSOZOMLARIN KARAKTERİZASYONU VE MAKROFAJ POLARİZASYONUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Ceren ESEN

(YÜKSEK LİSANS)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

TYL-2024-1666

BURSA-2025

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "***Brucella* ile Enfekte Edilmiş veya İnaktif *Brucella*'ya Maruz Bırakılmış Makrofajlardan Köken Alan Eksozomlarin Karakterizasyonu ve Makrofaj Polarizasyonuna Etkisinin İncelenmesi**" 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.

Ceren ESEN
Tarih ve İmza
07/03/2025

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

07/03/2025

Adı Soyadı: Ceren ESEN
Ana Bilim Dalı: İmmünoloji A.D.
Tez Konusu: *Brucella* ile Enfekte Edilmiş veya İnaktif *Brucella*'ya Maruz Bırakılmış Makrofajlardan Köken Alan Eksozomlarin Karakterizasyonu ve Makrofaj Polarizasyonuna Etkisinin İncelenmesi

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	■	❑	
Dış Kapak Sayfası	■	❑	
İç Kapak Sayfası	■	❑	
Kabul Onay Sayfası	■	❑	
Sayfa Düzeni	■	❑	
İçindekiler Sayfası	■	❑	
Yazı Karakteri	■	❑	
Satır Aralıkları	■	❑	
Başlıklar	■	❑	
Sayfa Numaraları	■	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	❑	
Kaynaklar	■	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı:
Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI ..... **II**
KABUL ONAY SAYFASI ..... **II**
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU ..... **III**
İÇİNDEKİLER ..... **V**
TÜRKÇE ÖZET ..... **VII**
İNGİLİZCE ÖZET ..... **IVIII**
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ .....**IX**
1.GİRİŞ **1**
2.GENEL BİLGİLER **2**
2.1. *Brucella* Türlerinin Tanımlanması ve Sınıflandırılması 2
2.2. *Brucella*'nın Virülans Faktörleri 3
2.3. Brusellozun İmmünopatogenezi 6
2.3.1. İmmünoregülasyon bileşenlerinin merkezi rolü 6
2.3.2. *Brucella*'ya karşı koruyucu bağışıklık 8
2.4. Hücresel Enfeksiyon Mekanizması 9
2.5. İmmün Sistem ve *Brucella* Etkileşimi 13
2.6. İmmün Yanıtın Düzenlenmesi ve *Brucella*'nın Kaçış Stratejileri 15
2.6.1. *Brucella* doğuştan gelen bağışıklık yanıtını zayıflatır 15
2.6.2. *Brucella'nın* konak tanıma mekanizmalarından kaçış stratejileri 16
2.6.3. *Brucella*'nın enflamatuar sinyal iletim mekanizmalarından kaçış stratejileri .. 18
2.6.3.1. *Brucella* adaptif bağışıklığı zayıflatır 18
2.7. Bakteriyel Dış Membran Vezikülleri (OMV) 20
2.7.1. Bakteriyel membran veziküllerinin (OMV) immün sistem etkileri 23
2.7.2. Eksozomlar 24
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER **27**
3.1. Gereçler 27
3.1.1.Çalışmada kullanılan maddeler; 27
3.1.2. Hazırlanan tamponlar ve çözeltiler ve besiyerleri 27
3.2. Yöntem 27
3.2.1. THP-1 hücre hatlarının çoğaltılması 27
3.2.2. *Brucella melitensis* (ATCC 234548) ve *Brucella abortus* (ATCC 23450) bakterilerinin üretilmesi 28
3.2.3. *Brucella melitensis* (ATCC 234548) ve *Brucella abortus* (ATCC 23450) bakterilerinin inaktive edilmesi 28
3.2.4. İnaktif *Brucella* suşları ile THP-1 hücre hatlarının muamele edilmesi 31
3.2.5. İnaktif *Brucella* suşları ile muamele edilmiş THP-1 hücrelerinin morfolojik analizleri 32
3.2.6. Eksozomların ve dış membran veziküllerinin (OMV) izolasyonu ve karakterizasyonu 33
3.2.6.1. *Brucella melitensis* (ATCC 234548) ve *Brucella abortus* (ATCC 23450) bakterilerinin üretilmesi 33
3.2.6.2. İnaktif *Brucella* ile muamele edilen THP-1 hücrelerinden eksozom izolasyonu 33
3.2.6.3. Western Blot analizleri ile eksozomal proteinlerin gösterilmesi 37
3.2.6.4. Canlı *Brucella* suşlarından dış membran vezikülü (OMV) izolasyonu 39

3.2.6.5. Canlı *Brucella* suşlarından dış membran vezikülü (OMV) karakterizayonu 40
3.2.7. Elde edilen eksozomların ve dış membran veziküllerinin (OMV'lerin) işaretlenmesi 40
3.2.8. THP-1 hücre hattından izole edilen bakteri kaynaklı eksozomlar ve canlı *Brucella* kaynaklı bakteriyel membran vezikülleri ile THP-1 hücrelerinin muamele edilmesi 41
3.2.8.1. Dir boyası ile işaretlenmiş inaktif *Brucella* suşlarına maruz bırakılmış THP-1 kaynaklı eksozomlarının ve canlı *Brucella* suşlarından izole edilen OMV'lerin THP-1 hücre hattı ile hücre kültürü 41
3.2.8.2. Dir boyası ile işaretlenmiş farklı *Brucella* türlerine maruz bırakılmış THP-1 kaynaklı eksozomların ve canlı *Brucella* kaynaklı OMV'lerin THP-1 hücre hattı ile hücre kültüründen akan hücre ölçer analizleri 43
3.2.9. Hücre içi Nitrik Oksit (NO) ve Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) akan hücre ölçer cihazında analiz edilmesi 45
3.2.9.1 Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) üretim analizi 45
3.2.9.2. Nitrik oksit (NO) üretim analizi 46
4. BULGULAR 48
4.1. İnaktif *Brucella* Suşları ile THP-1 Hücre Hatlarının Muamele Edilmesi 48
4.2. İnaktif *Brucella* Suşları ile Muamele Edilen THP-1 Hücre Hattının Diff Quick Boyaması 48
4.3. Canlı *Brucella* Suşları ile THP-1 Hücre Hatlarının Muamele Edilmesi 49
4.4. Canlı *Brucella* Suşları ile Enfekte Edilen THP-1 Hücre Hatlarının Gentamisin ile Muamele Edilmesi 50
4.5. İnaktif *Brucella* Türleri Kaynaklı THP-1 Eksozomlarının Karakterizasyonu 51
4.5.1. THP-1 hücre hattından elde edilen eksozomların miktarının Bikinkoninik Asit Tahlili (Bicinchoninic Acid Assay, BCA) yöntemi ile belirlenmesi 51
4.5.2. İnaktif *Brucella* suşları ile muamele edilen THP-1 hücre hattından eksozomların Bikinkoninik Asit Tahlili (Bicinchoninic Acid Assay, BCA) yöntemi ile belirlenmesi 52
4.6. İnaktif *Brucella* Türleri ile Muamele Edilen THP-1 Kaynaklı Eksozomların Akan Hücre Ölçer Cihazı ile Tetraspaninlerinin Analizi 53
4.7. İnaktif *Brucella* Türleri ile Muamele Edilen THP-1 Kaynaklı Eksozomların Western Blot Yöntemi ile Analiz Edilmesi 55
4.8. Canlı *Brucella* Türlerinden İzole Edilen Dış Membran Veziküllerinin (OMV) Karakterizasyonu 56
4.8.1. Canlı *Brucella* suşlarından kit ile izole edilen dış membran veziküllerinin (OMV) Bikinkoninik Asit Tahlili (Bicinchoninic Acid Assay, BCA) yöntemi ile belirlenmesi 56
4.8.2. Dış membran veziküllerinin karakterizasyonu için TRPS analizleri 57
4.8.3 Dir boyası ile işaretlenmiş *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomlarının ve canlı *Brucella* kaynaklı OMV'lerin THP-1 hücre hattı ile kültüründen akan hücre ölçer analizleri 58
4.8.4 Hücre içi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) ve Nitrik Oksit'in (NO) akan hücre ölçer cihazında analiz edilmesi 64
4.8.5 THP-1 hücre hatlarında inaktif *Brucella* türleri ve inaktif *Brucella* türleri kaynaklı eksozomların LPS varlığında akan hücre ölçer analizleri 67
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 72
6. KAYNAKLAR 77

7. SİMGELER VE KISALTMALAR 88
8. TEŞEKKÜR..... 90
9. ÖZGEÇMİŞ..... 91

TÜRKÇE ÖZET

Brucella fagositik hücrelerde özellikle makrofajlarda kendini saklayabilme yeteneğine sahiptir. Hücre içerisindeki eksozom ve bakteriyel membran vezikülleri oluşumu enfeksiyon sırasında immün tepkileri azaltabilir ya da indükleyebilir. Bu gibi sebepler kronik bruselloza sebep olmaktadır.

Çalışmamız kapsamında THP-1 monositik hücre hattı canlı *Brucella* suşlarına ve inaktive edilmiş *Brucella melitensis* ve *Brucella abortus*'a maruz bırakılacaktır. Buradaki amaç makrofaj hücrelerinde gerçekleşen enfeksiyonda hücrenin salgıladığı mediyatörleri, membran vezikülleri (MV) ve hücre dışı veziküllerini (EV) farklı tekniklerle analiz edebilmektir. Yapılan çalışmalar bruselloza, immün hücrelerin verdikleri tepkileri anlamamıza yardımcı olacaktır. Elde edilen sonuçlar *Brucella* enfeksiyonu ile ilgili literatürde eksik olan bilgilerin tamamlanmasına katkı sağlayacaktır. Kronik hastalığın ilerlemesinde veziküllerin önemi düşünüldüğünde bakteriyel membran vezikülleri ve eksozomların immünolojik etki ile incelenmesi önemli hale gelmektedir. Son zamanlarda enfeksiyon hastalıklarında eksozomların ve membran veziküllerinin rolü dikkat çekmeye başlamıştır. Bu nedenle projenin ilerleyen aşamasında elde edilen eksozomlar ile yeni bir koşul oluşturulmuştur. THP-1 hücreleri bakteriyel eksozomlara maruz bırakılarak çeşitli yüzey belirteçleri analiz edilmiştir. Aynı zamanda bakteriyel membran vezikülleri ve eksozomların karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışma kapsamında THP-1 makrofaj hücre hattının *Brucella* ve *Brucella* membran vezikülleri arasında immünolojik etkileri hem hücresel hem de eksozomal temelde incelenmiştir.

Sonuç olarak THP-1 monositik hücrelerinde *Brucella* türlerinin CD80, CD86, HLA-DR, CD163 CD169 ve CD206 yüzey belirteçleri analiz edilmiştir. Canlı *Brucella* türleri ile enfekte olan, inaktif *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomlarına maruz kalan ve canlı *Brucella* OMV'lerine maruz kalan hücrelerde CD80 ve CD86 seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Gözlemlenen bakteri kaynaklı artışlarla eksozom ve OMV yapılarının da yüzey belirteçlerinde anlamlı bir artış sergilediği fakat bu artışın direkt bakteri kaynaklık artışa oranla genel olarak daha az olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda hücrelerin ROS ve NO seviyelerinde bir azalma olduğu belirtilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Enfeksiyon hastalıkları, *Brucella*, makrofaj, THP-1 hücre hattı

İNGİLİZCE ÖZET

CHARACTERIZATION OF EXOSOMES ORIGINATING FROM MACROPHAGES INFECTED WITH *BRUCELLA* OR EXPOSED TO INACTIVE *BRUCELLA* AND EXAMINING ITS EFFECT ON MACROPHAGE POLARIZATION

Brucella has the ability to hide itself in phagocytic cells, especially macrophages. The formation of exosomes and bacterial membrane vesicles within the cell can reduce or induce immune responses during infection. Such reasons lead to chronic brucellosis.

In our study, the THP-1 monocytic cell line will be exposed to live *Brucella* strains and inactivated *Brucella melitensis* and *Brucella abortus*. The aim here is to analyze the mediators, membrane vesicles (MV), and extracellular vesicles (EV) secreted by macrophage cells during the infection using different techniques. The conducted studies will help us understand the responses of immune cells to brucellosis. The obtained results will contribute to filling the gaps in the literature regarding *Brucella* infection. Considering the importance of vesicles in the progression of chronic disease, the study of bacterial membrane vesicles and exosomes with immunological effects becomes significant. Recently, the role of exosomes and membrane vesicles in infectious diseases has begun to attract attention. Therefore, a new condition was created in the later stages of the project with the exosomes obtained. THP-1 cells were exposed to bacterial exosomes, and various surface markers were analyzed. At the same time, the characterization of bacterial membrane vesicles and exosomes has been conducted. Within the scope of the study, the immunological effects of the THP-1 macrophage cell line between *Brucella* and *Brucella* membrane vesicles were examined on both cellular and exosomal bases.

In conclusion, the surface markers CD80, CD86, HLA-DR, CD163, CD169, and CD206 of *Brucella* species were analyzed in THP-1 monocytic cells. In cells infected with live *Brucella* species, exposed to inactive *Brucella*-derived THP-1 exosomes, and exposed to live *Brucella* OMVs, an increase in CD80 and CD86 levels was observed. It has been shown that with the observed bacterial-induced increases, the exosome and OMV structures also exhibited a significant increase in surface markers, but this increase was generally less than the direct bacterial-induced increase. At the same time, a decrease in the ROS and NO levels of the cells has been noted.

Key words: Infectious diseases, *Brucella*, macrophage, THP-1 cell line

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ



Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "***Brucella* ile Enfekte Edilmiş veya İnaktif *Brucella*'ya Maruz Bırakılmış Makrofajlardan Köken Alan Eksozomlarin Karakterizasyonu ve Makrofaj Polarizasyonuna Etkisinin İncelenmesi"** başlıklı tez **3.** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

1. GİRİŞ

Bruselloz insanlardan hayvanlara bulaşabilen, zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır. Özellikle koyun, sığır, keçi, domuz ve köpeklerde bulunur. Hastalık insanlar üzerinde ateş, kas-eklem ağları, yorgunluk ve organ yetmezlikleri gibi semptomlarla kendini gösterebilir. *Brucella* fagositik hücrelerde özellikle makrofajlarda kendini saklayabilme yeteneğine sahiptir. Hücre içerisindeki eksozom ve bakteriyel membran vezikülleri oluşumu enfeksiyon sırasında immün tepkileri azaltabilir ya da indükleyebilir. Bu gibi sebepler kronik bruselloza sebep olmaktadır.

Bu tez çalışmasında THP-1 monositik hücre hattı, *Brucella* bakterilerinin makrofaj polarizasyonuna etkisini anlamak için kullanılmıştır. Bu kapsamda canlı *Brucella melitensis* ve *Brucella abortus* türleri kullanılmıştır. Aynı zamanda bu iki tür inaktive edilerek de çalışmaya dahil edilmiştir. Buradaki amaç monosit/makrofaj hücrelerinde gerçekleşen enfeksiyonda hücrenin salgıladığı mediyatörleri, membran veziküllerini (MV) ve hücre dışı vezikülleri (EV) farklı tekniklerle analiz edebilmektir. Yapılan çalışmalar bruselloza, immün hücrelerin verdikleri tepkileri anlamamıza yardımcı olmuştur. Elde edilen sonuçlar *Brucella* enfeksiyonu ile ilgili literatürde eksik olan bilgilerin tamamlanmasına katkı sağlamıştır.

Kronik hastalığın ilerlemesinde veziküllerin önemi düşünüldüğünde bakteriyel membran vezikülleri, hücre dışı veziküller ve eksozomların immünolojik etki ile incelenmesi önemli hale gelmektedir. Son zamanlarda enfeksiyon hastalıklarında eksozomların rolü dikkat çekmeye başlamıştır. Bu nedenle *Brucella* enfeksiyonunu anlamamız açısından farklı hücre dışı vezikül formları ile çalışılmıştır. THP-1 monosit hücreleri bakteriyel eksozomlara maruz bırakılarak çeşitli mediyatörler, membran vezikülleri (MV) ve hücre dışı vezikülleri (EV) analiz edilmiştir. Çalışma kapsamında THP-1 monositik hücre hattının *Brucella* ve *Brucella* vezikülleri arasında immünolojik (membran proteinleri) etki hem hücresel hem de eksozomal temelde incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Brucella* Türlerinin Tanımlanması ve Sınıflandırılması

Brucella, hem oksijenli hem de oksijensiz olarak yaşamını sürdürebilen bir diğer anlamıyla fakültatif bir bakteri türüdür. *Brucella* türlerinin neden olduğu zoonotik (hayvanlardan insanlara geçebilen hastalık türleri) hastalığa bruselloz denmektedir. İnsan brusellozu Malta ateşi ya da dalgalı ateş olarak da tanımlanmaktadır ve ilk olarak 1850'lerde Malta'da görülmüştür (Lai, Chen & Li, 2021). Dünya çapında en yaygın zoonozlardan biri olarak bilinmektedir (Oliveira, 2021). *Brucella* türleri her biri konakçı türüne göre farklı şekilde kategorize edilebilen 6 tür olarak ayrılmaktadır: *B. melitensis* (koyun ve keçiler), *B. abortus* (sığırlar), *B. suis* (domuzlar), *B. ovis* (koyunlar), *B. canis* (köpekler) ve *B. neotomae* (orman çölü sıçanları) (Qureshi ve ark., 2023). Ayrıca B. microti, B. inopinata, B. pappi, B. vulpis, B. ceti ve B. pinnipedialis olarak bilinen atipik (normal veya klasik özellikler göstermeyen organizmalar) türleri barıdıran on iki tür tanımlanmaktadır (Matle ve ark., 2021). *B. melitensis*, insanlar için en virülan (bir mikroorganizmanın (bakteri, virüs, mantar, parazit) hastalık yapma gücü) bakteridir. Brucella *abortus* için tanımlanmış 8 farklı biyovar (aynı tür içinde bulunan biyokimyasal, fizyolojik veya genetik özellikler bakımından farklı alt grupları ifade eden bir sınıflandırma) bulunmaktadır. Bu biyovarlar 1-7 ve 9 olarak sınıflandırılmaktadır. B. *melitensis* ise 3 farklı biyovara (1-3) sahiptir. Buna ek olarak B. suis 5 biyovara (1-4 ve 5) ayrılmaktadır. Diğer *Brucella* türleri ise biyovarlara sınıflandırılmamıştır. Bruselloz hastalığının dünya çapındaki *Brucella* zoonotik türleri *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* ve *B. canis*'tir (Matle ve ark., 2021).

İnsanlarda ve Hayvanlarda *Brucella* Türleri Brusellozun Küresel Yayılımı ve Bulaş yolları: Bruselloz, dünya çapında hem vahşi ve evcil hayvanları hem de insanları etkileyen zoonotik bir enfeksiyondur. Hayvanlar için, bruselloz genellikle düşük yapma ve ayrıca azalmış doğurganlık, kilo alımının azalması ve süt üretiminde düşüş görülmesi ile karakterize edilmektedir (Kurmanov ve ark., 2022). İnsan brusellozu çoğunlukla ölümcül değildir fakat vücutta çeşitli sistemleri (kas-iskelet sistemi, üreme, merkezi sinir sistemi vb.) önemli düzeyde etkileyerek sakatlıklar dahil ciddi ve bazen kalıcı hasarlara neden olabilmektedir (Matle ve ark., 2021). Bruselloz insanlar üzerinde halsizlik, iştahsızlık, sırt ağrısı, baş ağrısı, karın ağrısı ve titreme gibi genellikle yanlış tanıya yol açabilecek spesifik olmayan belirtilere neden olmaktadır

(Pappas, Papadimitriou, Akritidis, Christou & Tsianos, 2006). Gebe kadın hastalar için çoğunlukla gebelik döneminin ilk üç ayında düşük meydana gelebilmektedir (Khan, Mah & Memish, 2001). Aynı zamanda insanlarda yüksek risk grubu olarak görülen gruplar: çiftçiler, veteriner hekimler, mezbaha işçileri ve hayvanlarla ilgilenen diğer kişilerdir (Pappas ve ark., 2006). Buna ek olarak genel halk enfekte hayvanlardan kaynaklanan kontamine, pastörize edilmemiş çiğ süt ve süt ürünlerini tüketilmesi sebebiyle risk grubu olarak sayılmaktadır (Matle ve ark., 2021). Öncelikli endemik alanlar Akdeniz bölgesindeki orta ve düşük gelirli ülkeler, Afrika'da, Asya'da, Arap Yarımadası'nda Orta ve Güney Amerika'da bulunur aynı zamanda da önemli bölgesel farklılıklar içerir (Lai ve ark., 2021). Bu endemik ülkelerde, brusellozun yaygınlık değerleri 100.000'de 10'u geçmektedir (Chen ve ark., 2016). Dünya çapında düşünüldüğünde yarım milyonu geçen vaka sayısı olmasına rağmen, klinik belirtilerin spesifik olmaması ve geniş kapsamda olması yüzünden gerçek sayının çok daha fazla olabileceği düşünülmektedir (Godfroid ve ark., 2013).

Brucella'nın teşhis edilmesi için klinik muayene, biyolojik örnekler (kan, doku, beyin-omurilik sıvısı ve idrar) ile bakteri izolatlarının elde edilmesi, mikroskopi, biyokimyasal testler (fermentasyon testleri, katalaz, oksidaz ve üreaz) ve serolojik testleri (Rose Bengal testi, serum/lateks aglütinasyon testi, kompleman fiksasyon testi ve enzim bağlı immünosorbent testi) gereklidir (Kurmanov ve ark., 2022; Araj, 2010; Smirnova ve ark., 2013).

Bruselloz hastalığının önüne geçilebilmesi adına B. *melitensis* Rev.1, B. *abortus* S19 ve B. *abortus* RB51 gibi zayıflatışmış mutant Brucella türleri ile canlı zayıflatılmış aşılar geliştirilmiştir (Siadat, Salmani & Aghasadeghi, 2013; Kurmanov ve ark., 2022). Geliştirilen zayıflatılmış canlı aşıların çiftlik hayvanları üzerindeki bağışıklanması için etkili olmasına rağmen, insanlar adına güvenilir olmadığı ispatlanmıştır (Potter, 2013; Kurmanov ve ark., 2022).

2.2. *Brucella*'nın Virülans Faktörleri

Enfeksiyon sırasında, patojenlerin doğuştan gelen bağışıklık mekanizmalarıyla karşılaşması, hastalık gelişimini kontrol etmek için ilk inflamatuar yanıtları indüklemede çok önemlidir. Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve NOD benzeri reseptörler (NLR'ler) gibi desen tanıma reseptörleri, bakterilerdeki LPS, lipoproteinler

ve flagellin gibi patojenle ilişkili moleküler desenleri (PAMP'ler) tanımaktan sorumludur (Lapaque ve ark., 2006). *Brucella'*daki çeşitli virülans faktörlerinin varlığı, bu bakterilerin konakta hayatta kalmak ve kalıcı kronik bir hastalık oluşturmak için doğuştan gelen bağışıklık mekanizmalarından kaçmak için aktif ve pasif stratejiler geliştirmesine neden olmuştur. Bu virülans faktörlerinin tanımlanması, güçlü aşıların geliştirilmesinde önemli bir etkiye sahip olabilir. Ancak, insan brusellozundaki rollerini göstermek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Amjadi, Rafiei, Mardani, Zafari, & Zarifian, 2019).

Gram negatif bakterilerin dış zarında bulunan LPS, *Brucella* için önemli bir virülans faktörüdür. LPS, lipid A, oligosakkarit çekirdeği ve O-antijeni içerir. *Brucella* cinsinde lipid A, diğer Enterobacteriaceae'lerden daha uzundur ve bu da TLR-4 ile etkileşimin önemli ölçüde azalmasına ve daha az toksisiteye neden olur (Lapaque ve ark., 2006). *Brucella* cinsi, LPS'nin O-antijenine dayanarak pürüzlü ve pürüzsüz türlere ayrılır. *B. suis* gibi pürüzsüz suşlar, lipit sallarıyla etkileşime girerek makrofajlarda fagozom-lizozom füzyonunu engeller. LPS, α-defensin, NP-2 ve laktoferrin gibi antimikrobiyal katyonik peptitlere ve nitrik oksit (NO)'ye karşı direnci artırır (Band, & Weiss, 2014), serbest radikaller ve lizozim (Porte, Naroeni, Ouahrani-Bettache & Liautard, 2003). Endotoksik olmayan LPS'li *Brucella*, antimikrobiyal saldırıya karşı dayanıklıdır ve bağışıklık aracılarının sentezini önler (Lapaque, Moriyon, Moreno & Gorvel, 2005). *Brucella'*nın pürüzsüz suşları konak hücre apoptozunu engeller ve konakçının bağışıklık tepkisinden kaçınır (Bagüés, Terraza, Gross & Dornand, 2004) Bu nedenle, LPS hem konak hücrelerine nüfuz etmek hem de bağışıklık sistemi tarafından öldürülmeye karşı direnç için önemli bir bileşendir. Ancak, *Brucella* suşlarının LPS'si diğer enterik bakterilere kıyasla daha az toksiktir; bu nedenle, tümör nekroz faktörü üretiminin güçlü bir indükleyicisi değildir (Lapaque, Moriyon, Moreno & Gorvel, 2005). LPS'nin lipid A'sındaki yağ asidinin uzaması LPS-TLR4 etkileşimini önemli ölçüde azaltır (Hartigh, Rolán, Jong, & Tsolis, 2008). *BvrR/BvrS, Brucella'nın* lizozomal yoldan yapışmasında, penetrasyonunda, istilasında ve kaçışında önemli rol oynayan düzenleyici bir sensör sistemdir. Ayrıca bu sistem, Omp25 ve Omp22 gibi hücre yüzey proteinlerini kontrol eder (Manterola ve ark., 2007).

VirB operonu, konak hücre yapışmasında, içselleştirmede, hücre içi taşınmasında

ve replikasyonda rol alan Tip IV salgı sistemini (T4SS) kodlar. VirB operon ekspresyonu, *Brucella* içeren vakuolün asitleştirilmesinin ardından indüklenir. T4SS, efektör molekülleri taşıyarak ve pH'ı nötralize ederek *Brucella'nın* replikasyon nişinin kurulmasını ve hücre içi hayatta kalmasını sağlar. T4SS eksikliği olan mutant Brucella'nın *in vivo* fare modelindekalıcı enfeksiyon oluşturma yeteneğinin olmadığı gösterilmiştir (Arenas, Staskevich, Aballay & Mayorga, 2000).

VirJ, periplazmik bölgede lokalize olan hücre içi replikasyonda yer alan bir proteini kodlar. Bu protein, tip IV salgılamanın iki substratında (SepA ve Bpe123) önemli bir rol oynar. Ek olarak, VirB aygıtının merkezi bileşenleriyle bir kompleks oluşturabilir, bu nedenle VirJ bir salgılama platformunun parçasıdır (Del Giudice ve ark., 2016).

Siklik beta-1, 2 - glukanlar (CβG), *Brucella'nın* hücre içi hayatta kalması için gerekli olan osmoregulasyonlu periplazmik glukanlardır. Bu glukanlar, konak hücre zarlarında bulunan lipit salında hareket eder ve lizozomlarla füzyondan kaçınarak *Brucella* içeren vakuol olgunlaşmasını düzenler (Arellano-Reynoso ve ark., 2005).

Brucella yüzeyinde ifade edilen şaperonin ailesinin bir üyesi olan ısı şoku proteini 60 (Hsp60), invazyon öncesinde makrofajlardaki PrPC adı verilen hücresel bir prion'a bağlanır ve bu da konak hücreye yapışma ve hücre içi replikasyonla sonuçlanır (Watarai, Erdenebaatar, Makino, Horiuchi, Shirahata & Katamine, 2003).

Tablo 1. *Brucella*'nın virülans faktörleri (Amjadi, Rafiei, Mardani, Zafari, & Zarifian, 2019 türkçeye çevrilmiştir).

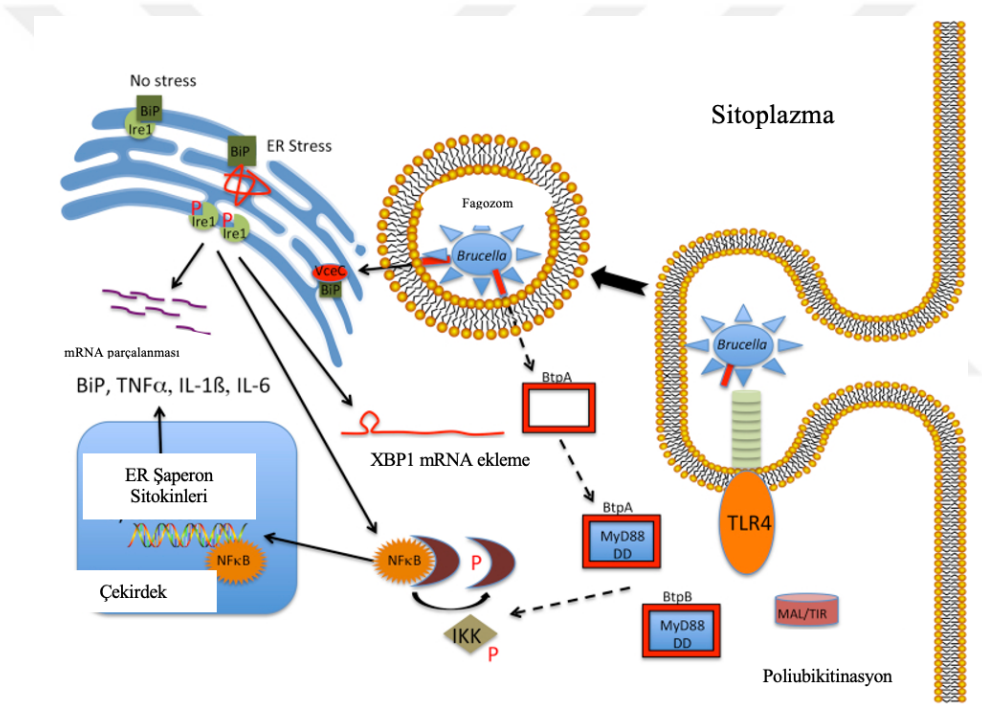
Virülans faktörü	Eylem Şekli	Sonuç
Katalaz (KAT)	H 2 O 2'nin H 2 O ve O 2'ye oksidasyonu	Bakterileri oksidanlara karşı korumak
Süperoksit dismutaz (SOD)	Süperoksidin (O_2^-) oksijene ve hidrojen peroksit (H_2O_2) 'e dönüşmesini katalize eder	Endojen ROS'u detoksifiye etmek ve *Brucella'yı* oksidatif öldürmeden korumak.
Üreaz (üre)	Üreyi hidrolize ederek karbonik asit ve iki molekül amonyak oluşturmak.	pH'ı düşürmek ve *Brucella'nın* yaşaması için asidik bir ortam sağlamak.
Alkil hidroperoksit redüktaz (ahpC&D)	*Brucella'da* aerobik metabolizma sonucu ortaya çıkan H_2O_2 ve hidroperoksitlerin detoksifikasyonu	Oksijen ve nitrojen oksidatif hasarına karşı koruma
Sitokrom oksidaz(cydDCAB)	Düşük oksijen gerginliğine adaptasyonla ilişkili genleri ifade etmek, ROS üretimini engellemek ve hücre içi bölmeyi detoksifiye etmek	Hücre içi büyüme
Nitrik oksit redüktaz (norD)	Denitrifikasyon için dört enzim içerir: nitrat redüktaz (Nar), nitrik redüktaz (Nir), nitrik oksit redüktaz (Nor) ve nitrüs oksit redüktaz (Nos)	Düşük oksijen gerginliği altında hayatta kalma ve NO'yu detoksifiye etme
Brucella virülans faktörü A(bvfA)	Asit şokuna yanıt olarak veya makrofajlar içinde düzenlenmektedir.	Güvenli bir hücre içi niş sağlamak.
Nramp 1 gen	İlk makrofaj ve doğuştan gelen bağışıklık tepkisi aktivasyonuna katılarak, makrofaj uygulamasında pleotropik etkiler oluşturur, fagosomal pH'ı asidik aralığa doğru modüle ederek	Hayatta kalma ve çoğalma

2.3. Brusellozun İmmünopatogenezi

2.3.1. İmmünoregülasyon bileşenlerinin merkezi rolü

Brucella'nın gizli doğası büyük oranda hücre yüzeyindeki lipopolisakkaritin (LPS) yapısına atfedilmiştir (Barquero-Calvo ve ark., 2007). Lipit A kısmındaki uzun yağ asidi moleküllerinin varlığının *Brucella* LPS'nin toksisitesini azalttığı ve zayıf bir TLR4 agonisti olarak görev yaparak bağışıklık tepkisini azalttığı gösterilmiştir. Bu, organizmanın konak hücrenin minimal aktivasyonuyla enfekte etme kapasitesiyle tutarlıdır (Starr ve ark., 2012). Ancak, LPS'nin O-polisakkarit kısmından yoksun olan

pürüzlü *Brucella* türleri makrofaj hücreleri için sitotoksiktir. Pürüzlü ve pürüzsüz brusellalardan elde edilen lipit A'nın karşılaştırmalı bir analizi yapılmamış olduğundan, yağ asitlerinin uzunluğunun değişeceğini varsaymak için bilimsel bir neden yoktur. Dahası, T4SS yokluğunda sitotoksik aktivitenin tamamen ortadan kalkması, sitotoksik aktivitede sadece LPS'nin bir rolü olmadığını gösterir. Şu anda en basit açıklama *Brucella* LPS'nin zayıf bir TLR4 agonisti olması, O-polisakkaritinin ise organizmanın kaçısında etkili olmasıdır. (Qin, Pei, Ancona, Shaw, Ficht & Figueiredo, 2008). *Brucella* LPS'nin zayıf agonist aktivitesine ek olarak, organizma doğuştan gelen bağışıklık yanıtını baskılayan yeni immün düzenleyici faktörler ifade eder (Şekil 1).



Şekil 1. Brusellozun immünopatogenezi şematik gösterimi. (*Brucella* yüzeyindeki mavi çıkıntılar LPS, *Brucella* TIRiçeren proteinler BtpA ve BtpB kırmızı kareler, MyD88 bağlanması mavi kareler, ER moleküler şaperonu yeşil kareler, IκBα kahverengi, dolu oklar *Brucella* aracılı aktivasyonu, noktalı oklar *Brucella* aracılı inhibisyonu gösterir.) ER, endoplazmik retikulum; IκBα, κB protein α inhibitörü; Iκκ, IκB kinaz; IRE1, inozitol gerektiren enzim 1; LPS, lipopolisakkarit; MAL, MyD88-adaptör benzeri; MYd88, miyeloid farklılaşma yanıt geni 88; T4SS, tip IV salgılama sistemi; TIRAP, Toll–IL-1 reseptör alanı içeren adaptör protein; TLR4, Toll benzeri reseptör 4; TNF-α, tümör nekroz faktörü α; UPR, katlanmamış protein yanıtı; XBP1, X-box bağlayıcı protein 1 (Figueiredo, Ficht, Rice-Ficht, Rossetti & Adams, 2015 türkçeye çevrilmiştir).

Brucella hem proinflamatuar bağışıklık tepkisini hem başlatır. Hem de inhibe eder. Enfeksiyon sırasında TLR4 sinyallemesi, LPS'nin toksisitesini azaltan uzun yağ asidi zincirlerinin varlığı ve *Brucella* TIR içeren proteinler, BtpA ve BtpB ile MyD88

bağlanması yoluyla aşağı akış IKK fosforilasyonunu bloke ederek kısıtlar ve bu da MAL'nin poliübikitinasyonunun ve bozunmasının artmasına neden olur (Jong ve ark., 2013). Ancak, T4SS efektörü VceC, XBP1'in mRNA eklemesini ve UPR aktivasyonunu teşvik etmek için IRE1'i serbest bırakmak ve fosforlamak üzere bir ER moleküler şaperonu olan BiP ile etkileşim yoluyla doğuştan gelen bağışıklık tepkisini uyarır. IRE1 fosforilasyonu ayrıca IκBα ile kompleksten NF-κB'nin serbest bırakılması yoluyla proinflamatuar tepkiyi arttırır. Bu iki yol arasındaki kritik ayrım, aktivasyon zamanlamasındadır. Konakçının erken veya MyD88 aracılı yanıtını inhibe etmek, replikatif bir nişin edinilmesini desteklerken, gecikmiş T4SS aracılı VceC efektör (VjbR kontrollü ekspresyon) yanıtı brusellanın yayılmasını artırabilir (Viadas, Rodriguez, Sangari, Gorvel, Garcia-Lobo & Lopez-Goni, 2010).

2.3.2. *Brucella*'ya karşı koruyucu bağışıklık

Brucella'ya karşı T yardımcı hücre tipi 1 (Th1) yanıtının önemi çok sayıda çalışma tarafından desteklenmektedir (Arenas-Gamboa, Rice-Ficht, Fan, Kahl-McDonagh & Ficht, 2012). Doğal öldürücü hücreler bazı konaklarda önemli rol oynar, ancak fare modelinde rollerinin minimal olduğu gösterilmiştir (Fernandes, Benson & Baldwin, 1995).

Sitokinler, hem doğuştan hem de edinilmiş bağışıklık tepkilerini aracılık ederek bruselloza karşı korumada önemli oyunculardır. B hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilen IL-12, Th1 yanıtına ve makrofajları aktive eden interferon-γ indüksiyonuna yol açar. İnterferon-γ'nin aktivitesi, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler tarafından üretilen tümör nekroz faktörü-α tarafından en üst düzeye çıkarılır. Raporlar ayrıca, IL-1'e bağlı koloni uyarıcı faktör indüksiyonunun, nötrofil ve makrofajların dalağa infiltrasyonunu artırdığını göstermektedir (Doyle, Halliday, Barnett, Dunn & Hume, 1992). Bu durum, T hücreleri tarafından üretilen IL-6'nın rolünü de açıklayabilir. Enfekte konakçıların dalak hücreleri, Th1 yanıtıyla tutarlı olarak, IL-2, interferon-γ ve IL-10 için daha yüksek mRNA seviyeleri ve IL-4 için daha düşük mRNA seviyeleri ifade eder.

Enfeksiyonda daha sonra gözlemlenen artan IL-10, *Brucella*'nın koruyucu Th1 yanıtının baskılanmasından kaynaklanan bağışıklık gözetiminden kaçınma kapasitesini destekleyebilir (Zaitseva ve ark., 1995). İlginç bir şekilde, benzer *Brucella*

suşlarına karşı hücresel ve humoral bağışıklık tepkileri duyarlı konakçılar arasında önemli ölçüde farklılık göstermektedir. *Brucella* immünobiyolojisinin bu kafa karıştırıcı yönü, yönetilebilir model hayvan sistemlerinde bağışıklık korumasının güvenilir korelasyonlarının belirlenmesinde önemli zorluklar ortaya çıkarmıştır (Figueiredo, Ficht, Rice-Ficht, Rossetti & Adams, 2015).

2.4. Hücresel Enfeksiyon Mekanizması

Brucella konak hücreleri istila edebilen ve enfekte ettiği hücrede yaşamını sürdürebilen aynı zamanda kronik enfeksiyonlara yol açan gram-negatif fakültatif bir hücre içi bakteri tipidir (Erkyihun, Gari & Kassa, 2022; Kurmanov ve ark., 2022). *Brucella* türleri arasında insanlar için zararlı olan türler B. *suis*, B. *abortus* ve B. *melitensis*'tir (Olsen & Palmer, 2014). Bruselloz genel olarak üç belirgin faza ayrılmaktadır: klinik belirtiler ortaya çıkmadan önceki kuluçka fazı (enfeksiyondan sonraki 2 gün olarak ifade edilebilir), patojenin konak dokusunda yayıldığı akut faz (enfeksiyon sonrasındaki 2 gün ile 3 hafta içerisinde) ve son olarak ciddi organ hasarına aynı zamanda konak organizmanın ölümüne yol açabilen kronik faz (6 ay ila 1 yıl arasında veya daha fazla) (Grilló, Blasco, Gorvel, Moriyón & Moreno, 2012). Genellikle, doğal bağışıklığın kuluçka döneminde yüksek oranda aktive olmadığı düşünülmektedir. Bu, *Brucella*'nın retiküloendotelyal sistem (tek çekirdekli fagositik sistem/mononükleer fagositik sistem) boyunca yayılmasına ve fagositler içinde bir replikasyon mekanizması kurmasına olanak tanır (Martirosyan, Moreno, & Gorvel, 2011). *Brucella* enfeksiyonunun erken fazında *Brucella*, kompleman sistemin zor aktive olmasını sağlar ve sitokin seviylerini minimum düzeyde indükler. Enfekte olan bölgede pro-inflamatuar hücrelerin alımı zayıf olmaktadır (Barquero-Calvo ve ark., 2007).

Brucella, klasik yolakla kompleman sistemini veya granülositleri zorla aktive ettiğinden, çok az doku hasarına neden olur ve lökositoz, artmış nötrofil sayısı ve azalmış trombositler gibi belirgin kan değişikliklerine yol açmaz, inkübasyon döneminde koagülasyon (pıhtılaşma) lezyonları nadiren görülür (Barquero-Calvo ve ark., 2007). Enfeksiyon, kuluçka döneminden sonra güçlü adaptif bağışıklığı ortaya çıkarmaktadır. Hayvanlar üzerinde kürtaj ve kısırlık meydana gelirken, insanlar üzerinde yüksek ya da dalgalı ateş gibi belirgin klinik semptomlar gözlemlenmektedir.

Enfeksiyon akut faza geçtiğinde ise *Brucella*, dendritik hücrelerde (DH) ve makrofajlarda aktif olarak çoğalmaya başlar. *Brucella* enfeksiyonunun ayırt edici yanlarından biri, enfekte olan dendritik hücreler (DH) ve makrofajlar tarafından üretilen sitokin ve kemokin düzeylerinin uzun süreli ve düşük olmasıdır. Aynı zamanda polimorfonükleer (PMN) hücrelerden salgılanan proinflamatuar sitokinlerin üretimlerinin düşük olması ve doğal öldürücü hücrelerin (NK) aktivasyonlarının düşük olmasıdır (Guo ve ark., 2023).

Brucella bakterilerine karşı ilk savunma hattı olarak; polimorfonükleer (PMN) hücreler, dendritik hücreler, makrofajlar, doğal öldürücü hücreler (NK), kemokinler, örüntü tanıma reseptörleri (PRR) ve kompleman sistemin fagositoz etkisi harekete geçmektedir (Diacovich, & Gorvel, 2010; Jiao ve ark., 2021). *Brucella* enfeksiyonun öncelikli hedef hücreleri enfeksiyonun ilk aşamasında makrofajlar, trofoblastik hücreler (TE) ve diğer fagositik hücrelerdir (Xiao ve ark., 2022). Bu hücreler *Brucella* bakterisi için sadece çoğalma ve hayatta kalma açısından değil, aynı zamanda diğer organ sistemlerini enfekte edebilmek için bir araçtır. Makrofajlar hücre içi patojenlerin kontrolü ve temizlenmesinde önemli rol oynayan fagositik hücrelerdir. Bu hücreler sadece patojenleri öldürmek ve doğal bağışıklığı gerçekleştirmekle kalmaz, aynı zamanda adaptif bağışıklığı başlatmakta yardımcı olur. Bu sırada IL-1, IL-6 ve IFN-γ gibi salgılanan sitokinler bağışıklık sisteminin tepkisini düzenleyerek daha fazla makrofajın ve lenfositin aktive olmasını sağlayarak bağışıklık tepkisini düzenlemede rol oynarlar (Weiss & Schaible, 2015). Makrofajlar, vücudu istila eden Brucella'nın çoğunu ortadan kaldırabilir. Bununla birlikte, *Brucella'*nın bağışıklık sisteminden kaçabilen ve konakçının istila etmek, hayatta kalmak ve üremek için makrofajları kullanabilen küçük bir kısmı da bulunmaktadır.

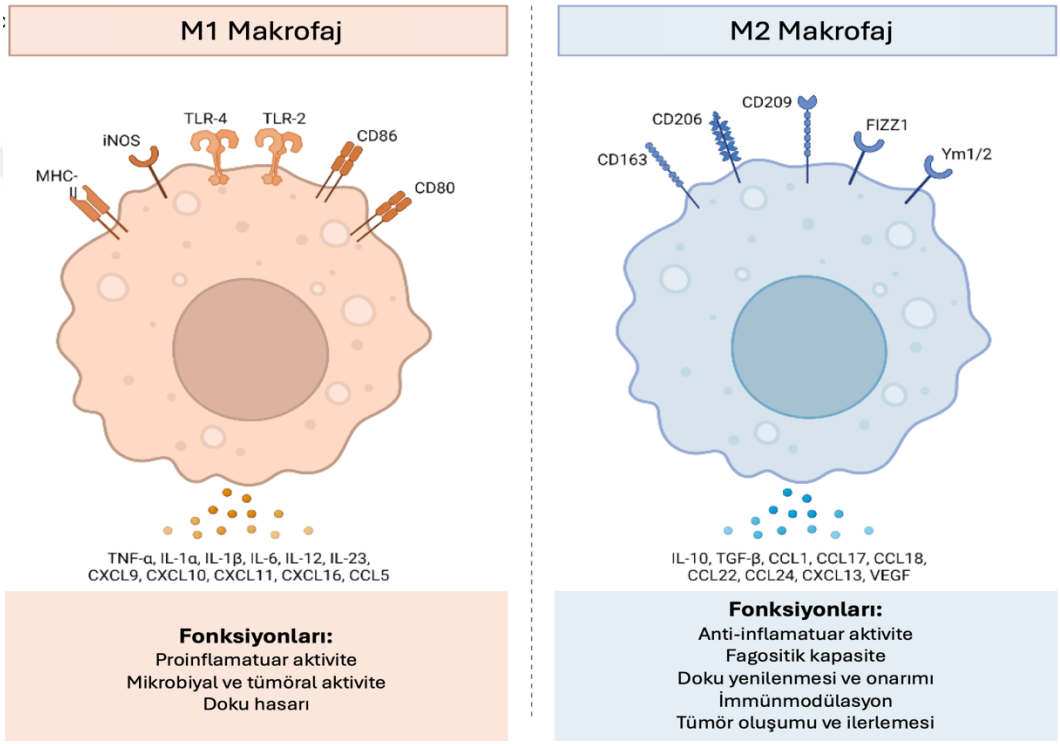
Monositler/makrofajlar, patojenlere karşı immün yanıtlarda önemli rol oynamaktadırlar. Kemik iliğinden çıktıktan sonra monositler farklı dokulara göç ederek çok çeşitli fenotipik aynı zamanda fonksiyonel özellikler sergileyen makrofajlara farklılaşabilirler. Temel olarak iki makrofaj tipi tanımlanmaktadır: klasik makrofajlar (veya M1; CD14++ CD16-) ve alternatif makrofajlar (veya M2; CD14+ CD16++). Monosit ve makrofajlar *Brucella* enfeksiyonunda merkezi bir rol oynamaktadırlar. B.*abortus* monositlerde ve makrofajlarda hücre içi olarak yaşamını sürdürebilen bir patojendir (Serafino ve ark., 2022).

Öte yandan makrofajlar klasik (M1), alternatif (M2) veya diğer daha az tanımlanmış profillere ayrılabilmektedirler. Farklı özelliklere göre makrofaj fenotipleri, immün yanıtlarda birçok role sahiptir. M1 makrofajları ürettikleri sitokinler tarafında proinflamatuar bir role sahiptir. Ancak dört alt tipe ayrılan M2 makrofajların birçok rolü bulunmaktadır. Örneğin M2a makrofajları parazit öldürmede önemli bir rol oynar, M2b makrofajları bağışıklık sistemi düzenleyicileri olarak işlev görmektediri M2c makrofajları yara iyileşme sürecine yardımcı olmaktadır ve M2d makrofajları pro-anjiyojenik bir role sahiptir. Makrofaj polarizasyonu, makrofaj fenotiplerinin mikroçevrelerinden gelen sinyallere maruz kalma tepkilerindeki değişikliklerdir Klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar (M1) ve alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar (M2) olan makrofajların iki ana polarizasyon fenotipi büyük ölçüde karakterize edilmiştir (Gharavi, Hanjani, Movahed, & Doroudian, 2022; Yasin, Idrus, Hoe, & Yvonne-Tee, 2022).

Enfeksiyonun erken seyrinde, patojenlere karşı ilk savunma hattı olarak makrofajlar, toll benzeri reseptör 2 (TLR2) veya toll benzeri reseptör 4 (TLR4) ve nükleotit-benzeri reseptörler gibi örüntü tanıma reseptörlerinin (PRR'ler) ekspresyonu ile istilacı mikropları tanıyabilir ve bunlara hızla yanıt verebilir. Gram negatif bakteriyel enfeksiyonlara karşı artan duyarlılık gösteren bağlayıcı oligomerizasyon alanı (NOD) benzeri reseptörlerdir (NLR'ler). Daha sonra makrofajlar, interlökin-6 (IL-6), IL-1β, tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) gibi enflamasyonla ilişkili sitokinleri ve C–C motifli kemokin 2 (CCL2) gibi kemokinleri salgılamak üzere aktive edilir. CCL5, istilacı mikroorganizmaları ortadan kaldırmak için daha fazla makrofaj ve nötrofilleri bölgeye toplar (Murray, 2017).

M1-polarize makrofajlarda CD80 ve CD86 yüzey belirteci olarak ifade edilir. Ayrıca makrofajlarda iNOS (NO sentaz 2, NOS2 olarak da adlandırılır), savunma sisteminde önemli bir haberci ve efektör molekül olan NO sentezlemek için indüklenir (Barley ve ark., 2022; Qu, Zhu, & Zhang, 2022). M2 polarize makrofajlar, düşük fagositik ve bakteriyel öldürme kabiliyetine sahip bir anti-enflamatuar fenotip olarak bilinir ve bunlar genellikle doku hasarını önlemek için bakteriyel enfeksiyonların sonraki seyrinde öne çıkar. M2 makrofajlar, IL-10, transforme büyüme faktörü-beta (TGF-β) ve Arginaz-1 (Arg-1) gibi anti-enflamatuar sitokin aracılarının fonksiyonel ekspresyonunun yanı sıra alternatif aktivasyon belirteçleri CD206, CD163 ile

karakterize edilir (Qu ve ark., 2022; Arti, Guerfali, & Laouini, 2018). Makrofajların düşük bakterisidal yeteneğe sahip spesifik M2 fenotipinin, bakteriyel patojenlerin hayatta kalmak için bağışıklıktan kaçışına da faydalı olduğu düşünülmektedir (Qu ve ark., 2022) (Şekil 2). Makrofajların, bakteriyel enfeksiyon ve bakteriyel bileşenlerin zaman ve dozuna ve ayrıca farklı sitokinler gibi yerel çevresel uyaranlara bağlı olarak proinflamatuar M1 fenotipi veya antiinflamatuar M2 fenotipinin dinamik bir dengesinde tutulduğu tahmin edilmektedir.



Şekil 2. M1 ve M2 makrofaj fenotipleri (Roa-Vidal, Rodríguez-Aponte, Lasalde-Dominicci, Capó-Vélez, & Delgado-Vélez, 2023 türkçeye çevrilmiştir).

CD163 yüzey belirteci üzerinden bakıldığında, bu belirteç bir transmembran proteindir ve monosit/makrofaj hücrelerinin yüzeylerinde sergilenmektedir. Hemoglobin-haptoglobin komplekslerinin ortadan kaldırımasında önemli görevler üstlenen reseptörlerdir. Aynı zamanda M2 makrofaj türlerinin bir belirtecidir. Anti-inflamatuar sitokinler CD163 seviyelerini arttırırken pro-inflamatuar IFN-γ gibi sitokinler CD163 ifadesini baskılamaktadırlar (Jacho ve ark., 2024).

M2 makrofaj grubunun bir diğer belirteci CD206'dır ve bir transmembran reseptörüdür. C-tip lektin ailesine ait bir proteindir. Diğer makrofajlarda olduğu gibi patojenlerin tanınması, patojenlerin fagosite edilmesi ve patojenlerin eliminasyonu ile

ilişkilidirler. M1 tip makrofaj gruplarında düşük seviyede ya da hiç ekspresyon göstermemektedirler. IL-13 ve IL-4 gibi sitokinler ile indüklenirler (Martinez, & Gordon, 2014). CD169 yüzey belirteci Siglec-1 olarak da isimlendirilmektedir. İmmün hücreler arasındaki etkileşim mekanizmalarında önemli rol oynamaktadır (Macauley, Crocker, & Paulson, 2014).

2.5. İmmün Sistem ve *Brucella* Etkileşimi

İmmün sistem, doğuştan (spesifik olmayan) ve edinilmiş (spesifik) bağışıklık yanıtları olarak iki ana kısımdan oluşur. Doğuştan bağışıklık, patojenlere hızlı ve genel bir şekilde tepki verirken, edinilmiş bağışıklık daha yavaş çalışıp uzun ömürlü immün hafıza oluşturur. Doğuştan bağışıklık sistemi, enfeksiyon ya da yaralanma bölgesindeki hücreleri yönlendirebileceği gibi, antijenleri lenfoid dokuya taşıyarak spesifik yanıtları tetikleyip adaptif bağışıklık hücrelerini aktive eder. (Li T., 2022; Zhong, Tien, Shu & 2006).

Bağışıklık sisteminin, doğuştan (spesifik olmayan) yanıtı: Patojenlere hızlı tepki verip genel bir savunma mekanizması oluşturur. Adaptif (spesifik) yanıtı: Daha yavaş devreye girer; ancak antijenle karşılaşıldıktan sonra spesifik bir yanıt üreterek uzun ömürlü immün hafıza oluşturur (Medina, 2016). Her iki yanıt birbirini destekler. Örneğin, doğuştan gelen sistem, enfeksiyon veya yaralanma bölgesine ilgili hücreleri çekip antijenleri lenfoid dokulara taşır; böylece adaptif yanıtın, T ve B hücreleri aracılığıyla spesifik savunma tepkisinin aktive edilmesi sağlanır (Zhong, Tien & Shu, 2006).

Patogen saldırısına karşı ilk savunma hattı olarak, doğuştan gelen bağışıklık, patojenle ilişkili moleküler desenleri (PAMP'ler) tanıyan konak desen tanıma reseptörleri (PRR'ler) ile tanıma gerçekleştirir ve bu da iltihaplanma sitokinleri ve interferonların (IFN'ler) üretimini başlatarak patojenleri konaktan yok eder (Hu & Shu, 2018; Xia, Yi, Wu, Shang & Shu, 2019).

Adaptif bağışıklık, dendritik hücreler, fagositler, sitotoksik lenfositler gibi antijen sunan hücreleri aktive ederek ve antikor üretimini teşvik ederek doğuştan gelen bağışıklığa ikincil bir savunma mekanizması görevi görür (Travers ve ark., 2001; Alberts ve ark., 2002).

Brucella, konakçı ile uzun süreli etkileşimler sırasında evrimsel adaptasyonlara

uğrar ve öncelikle bağışıklık tepkilerinden kaçınmak, bunlara müdahale etmek veya onları bastırmak için "gizli" stratejiler kullanır ve bu da kronik ve kalıcı enfeksiyonların oluşmasına yol açar. (Cardoso, Macedo, Azevedo & Oliveira 2006; Lacerda, Salcedo & Gorvel, 2013). *Brucella*, dendritik hücreler, makrofajlar ve plasental trofoblast hücrelerinde güçlü bir şekilde çoğalabilir ve kalıcı olabilir (Copin ve ark., 2012).

Brucella enfeksiyonu, invazyon, akut ve kronik evreler olarak üç aşamada incelenebilir. İlk evrede, konak hücreler bakterinin çoğalmasını sınırlamak amacıyla doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini aktive eder; daha sonraki evrelerde ise spesifik adaptif bağışıklık sistemi devreye girerek enfeksiyona karşı daha hedefe yönelik yanıtlar oluşturur. (Baldwin & Goenka, 2006). *Brucella*, konağın bağışıklık yanıtından kaçınmak için farklı mekanizmalar geliştirir, bu da bakterinin kolonizasyonunu, büyümesini ve uzun süreli çoğalmasını sağlar. Kronik enfeksiyon, *Brucella* ile konak arasında uzun vadeli bir denge oluşması kronik enfeksiyonun ortaya çıkmasına yol açar. (Guo, ve ark., 2023).

Doğal immün sistemin üyelerinden biri olan makrofajlar *Brucella*'nın enfeksiyonu sürdürmek için hedef aldığı başlıca hücrelerden biridir. (Gomes, 2012; Celli, 2019; Bhagyaraj ve ark., 2021). TLR4 ve diğer LPS-duyarlı doğuştan gelen algılama sensörlerinden kaçınmak için *Brucella* düşük endotoksik LPS eksprese eder. (Forestier, Deleuil, Lapaque, Moreno & Gorvel, 2000; Martirosyan, Moreno & Gorvel, 2011). *Brucella* ayrıca dendritik hücreleri enfekte edebilir ve dendritik hücre olgunlaşmasını baskılayabilir (Salcedo ve ark., 2008). TLR2 ve TLR4 sinyalizasyonuna müdahale etmek için *Brucella*, NF-κB aktivasyonunu ve sitokin sekresyonunu baskılamak üzere memeli Toll/interlökin 1 reseptör (TIR) alanı içeren adaptör protein (TIRAP) için bir analog olan TcpB üretir. (Alaidarous, 2014) (Snyder, 2014). TcpB ayrıca kaspaz 1, 4 ve 11'i de bozabilir ve sonuçta IL-1 üretimini baskılayabilir (Jakka, Namani, Murugan, Rai & Radhakrishnan, 2017). Konak adaptif bağışıklık tepkilerini en aza indirmek için *Brucella*, MHC sınıf I ve sınıf II moleküllerinin inhibisyonu yoluyla antijen sunumunu kesintiye uğratma kapasitesine sahiptir. (Barrionuevo & Giambartolomei, 2019; Velásquez, ve ark., 2017).

Brucella bakterileri, fagositik veya fagositik olmayan hücrelere girdiklerinde, orijinal fagozomun bakteriye özgü zarla yeniden düzenlenmesiyle oluşan "*Brucella*

içeren vakuol" (BCV) adı verilen zarla çevrili yapı içine alınırlar. Enfeksiyonun başlangıcında, *Brucella* lipit salları aracılığıyla konak hücre zarlarıyla etkileşime girerek hücre içi taşınmayı kolaylaştıran bu özel bölmeyi oluşturur (Gomes ve ark., 2012; Roop, Barton, Hopersberger & Martin, 2021). Oluşan BCV, geçici olarak endosomlarla kaynaşarak erken endosomal *Brucella* içeren vakuol (eBCV) meydana getirir; bu yapı, taşıma sürecinde erken endosomal belirteçlerini kaybeder. Çoğu eBCV lizozomal yıkım sürecine maruz kalırken, az bir kısmı bu temizleme işleminden kaçarak enfeksiyonun devamını sağlar. (Comerci, Martínez-Lorenzo, Sieira, Gorvel & Ugalde, 2001; Delrue ve ark., 2001; Celli, Chastellier., Franchini, Pizarro-Cerda, Moreno & Gorvel 2003; Salcedo ve ark., 2013)

Literatürde, eBCV'nin lizozomlarla birleşerek olgunlaşma sürecine girdiği ve endoplazmik retikulum (ER) ile entegrasyon sağladığına dair bulgular bulunmaktadır (Starr, Ng, Wehrly, Knodler & Celli 2008). Bu süreçte, eBCV, *Brucella*'nın çoğalmasını gösteren, olgun bir vakuole (rBCV) dönüşmektedir. ER, *Brucella*'nın çoğalmasını ve patojenitesini arttıracak faydalı bir ortam sağlar (Sedzicki ve ark., 2018).

2.6. İmmün Yanıtın Düzenlenmesi ve *Brucella*'nın Kaçış Stratejileri

2.6.1. *Brucella* doğuştan gelen bağışıklık yanıtını zayıflatır

Doğuştan gelen bağışık sistemi hücreleri, patojenlere karşı ilk savunma görevi görmektediler ve istilacı patojenlerin engellenmesinde ve eliminasyonunda önemli bir rol oynamaktadırlar (Wu, Lei, Xia, Zhong, Yang & Shu, 2019). Makrofajlar gibi doğal immün sistem hücrelerinin rol aldığı bu savunma, PRR ve PAMP gibi immün moleküllerin ve kompleman sistemlerinin koordineli etkileşimleriyle gerçekleşir (Martirosyan, Moreno & Gorvel, 2011).

Memeliler, Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), RIG-I benzeri reseptörler (RLR'ler), Nod benzeri reseptörler (NLR'ler), AIM2 benzeri reseptörler (ALR'ler), C tipi lektin reseptörleri (CLR'ler) ve cGAS gibi hücre içi DNA sensörleri dahil olmak üzere birkaç farklı PRR sınıfına sahiptirler (Akira, Uematsu & Takeuchi, 2006; Cai, Chiu & Chen, 2014).

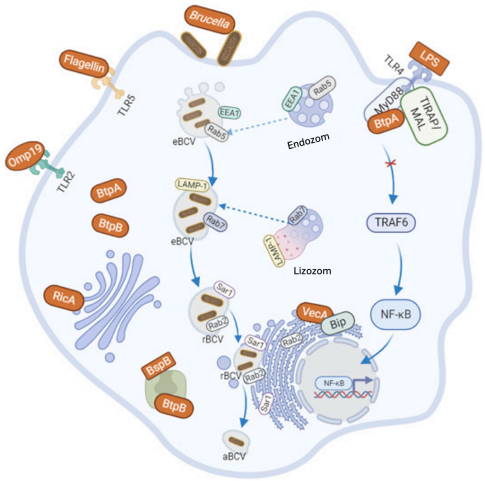
Bu reseptörler arasında TLR'ler ilk tanımlanmış olan ve en iyi karakterize edilen reseptördür. TLR ailesi, insanda 10 üyeden (TLR1–TLR10) ve farede 12 üyeden

(TLR1–TLR9, TLR11–TLR13) oluşmaktadır (Botos, Segal, Davies, 2011). Bu reseptörler PAMP'ları tanıyarak konak savunmasını güçlendirmek için ve patojen istilasını yok etmek için uygun bağışıklık tepkilerini başlatmaktadırlar. *Brucella* bakterisinin hücreye enfekte olduğu durumlarda immün sistemden kaçmak için çeşitli stratejiler kullanır ve PRR'ler tarafından kaçmaya çalışır (Martirosyan, Moreno & Gorvel, 2011).

2.6.2. *Brucella'nın* konak tanıma mekanizmalarından kaçış stratejileri

Brucella'nın yüzeyinde bulunan lipopolisakkaritler (LPS), lipoproteinler ve kamçı gibi moleküler bileşenleri, PRR'lerin onları algılamasını zorlaştırır ve böylece doğuştan gelen bağışıklık sistemi etkili bir şekilde uyarılamaz. (Gorvel, 2008). Gram negatif bakterilerin dış zarlarında Lipopolisakkaritlerin (LPS) yapısal bileşeni lipit A bulunmaktadır. LPS'in lipit A kısmı TLR4 tarafında tanınır ve böylece inflmatuar yanıt başlaması sağlanır. Daha uzun yağ asidi zincirlerine (C28) sahip olan *Brucella* LPS'nin lipidi A TLR4 tarafından tanınmasını zorlaştırır ve İnflamatuar yanıtın aktivasyonunu baskılamayı sağlar (Lapaque ve ark., 2006).

Ayrıca, çoğu bakterinin sahip olduğu flagellin'in spesifik bir yapısal alanı vardır ve TLR5 tarafından tanınarak inlamatuar yanıtın başlamsı sağlanır ama *Brucella* tarafında üretilen flagellin'in TLR5'i aktive edecek spesikik yapısal bir alanı yoktur bu durum immün sistemden kaçmasına olanak sağlamaktadır (Andersen-Nissen ve ark., 2005; Hoebe, Janssen & Beutler, 2004).



Şekil 3. *Brucella*'nın replikasyon döngüsü ve doğuştan gelen bağışıklıktan kaçma stratejileri (Yang, Wang, Hou, Sun, Xia & Wu, 2024 türkçeye çevrilmiştir).

Brucella kendine konak bulduğunda hücre membranına lipid sallar yardımı ile yağışır ve içeriye taşınma için hücre içi vezikülleri kullanır. Konak hücreye giren *Brucella*, *Brucella* içeren vakuol (BCV) olarak isimlendirilen bir vezikül oluşturur. BCV erken BCV'ye (eBCV) dönüşmek için bazı konak işaret moleküllerini (EEA1 ve Rab5) biriktirir. EBCV, lizozomlarla etkileşir ve lizozomların zararlı etkilerini inhibe etmek için çeşitli konak proteinlerini kullanır. T4SS yardımı ile eBCV'nin ER'ye transferi kolaylaştırılır ve burada Rab2 ve Sar1 molekülleri ile rBCV sentezi gerçekleşir. *Brucella* çoğalması için endoplazmik retikulum ideal bir ortam sunar. ER'ye yerleşen *Brucella*'lar ER içeriğini boşaltırlar ve patojenik enfeksiyon döngüsü başlar. *Brucella*'nın immün sisemden kaçmak için kullandığı çeşitli kaçış mekanizmaları ile immün sistem gözetiminden kaçması sağlanır (Yang ve ark., 2024).

Brucela'nın enfekte olmasından sonra hücre içerisinde %90'ı hidrolize edici enzimlerin etkisiyle öldürülür (Celli, Chastellier, Franchini, Pizarro-Cerda, Moreno & Gorvel, 2003). Ancak kalan %10'u konak hücrede başarılı bir şekilde çoğalmak için ve bağışıklık sinyal akışını manipüle etmek için tip IV salgılama sistemini (T4SS) geliştirmiştir (Ke. Wang. Li & Chen 2015; Xiong ve ark., 2021).

BtpA ve BtpB, *Brucella*'nın önemli virülans faktörleri olup, Toll/İnterlökin-1 reseptörü (TIR) yapısal alanları içerir. Bu alanlar, TLR sinyal yolunu baskılayarak doğuştan gelen bağışıklık yanıtını düzenleme yeteneğine sahiptir. BtpA ve BtpB, *Salmonella*, *Escherichia coli* ve *Brucella* gibi bakterilerde tanımlanan ve ökaryotik TIR alanlarıyla benzerlik gösteren bir protein ailesine aittir (Newman, Salunkhe, Godzik & Reed, 2006; Cirl ve ark., 2008; Lacerda, Salcedo & Gorvel, 2013).

TIRAP (aynı zamanda MAL olarak da bilinir), Toll/İnterlökin-1 reseptörü (TIR) alanı içeren bir adaptör proteindir ve MyD88 ile etkileşerek Toll-benzeri reseptör (TLR) sinyal yolunu aktive eder. Özellikle TLR2 ve TLR4'ün sinyal iletiminde, TIRAP, MyD88'in reseptör kompleksine bağlanmasına aracılık eder (Verstak, Nagpal, Bottomley, Golenbock, Hertzog & Mansell 2009).

BtpA, MyD88'e rekabetçi bir şekilde bağlanır ve TIRAP/MAL kaynaklı NF-κB aktivasyonunu etkili bir şekilde bloke ederek poliubikitinasyonunu artırarak fosforlanmış TIRAP/MAL'in bozulmasını teşvik eder. BtpB ayrıca MyD88 ile etkileşime girer ve NF-κB'nin çekirdeğe translokasyonunu önler (Felix, Kaplan Türköz & Ranaldi, 2014; Radhakrishnan & Splitter, 2010).

2.6.3. *Brucella*'nın enflamatuar sinyal iletim mekanizmalarından kaçış stratejileri

Çoklu dış membran proteinleri (Omps) enflamatuar tepkileri düzenlemede görev alırlar ve *Brucella*'nın kendi kendisini çoğaltmasını teşvik ederler. Özellikle, Omp25 ve Omp31, *Brucella*'nın virülansı ile ilişkili önemli Omps'lerdir ve Omp25'in silinmesinin virülansı azalttığı bilinmektedir. Omp25'in TNF-α ile ilişkili mikroRNA'ları yukarı regüle ettiği, TNF-α üretimini inhibe ettiği ve NF-κB yolunun aracılık ettiği enflamatuar faktörlerin salınımını baskıladığı bulunmuştur (Jubier-Maurin ve ark., 2001; Luo ve ark., 2018).

Omp31, bakteriyel istila, yerleşme ve replikatif ekolojik nişlerin oluşumu için gerekli olan *Brucella*'nın dış zarının bütünlüğünün korunmasında kritik bir rol oynar. (Verdiguel-Fernández ve ark., 2020) Omp31 ile indüklenen otofaji, NF-κB p65 sinyal yolunu negatif yönde düzenleyerek TNF-α ekspresyonunun inhibisyonuna yol açar (Wang ve ark., 2021).

2.6.3.1. *Brucella* adaptif bağışıklığı zayıflatır

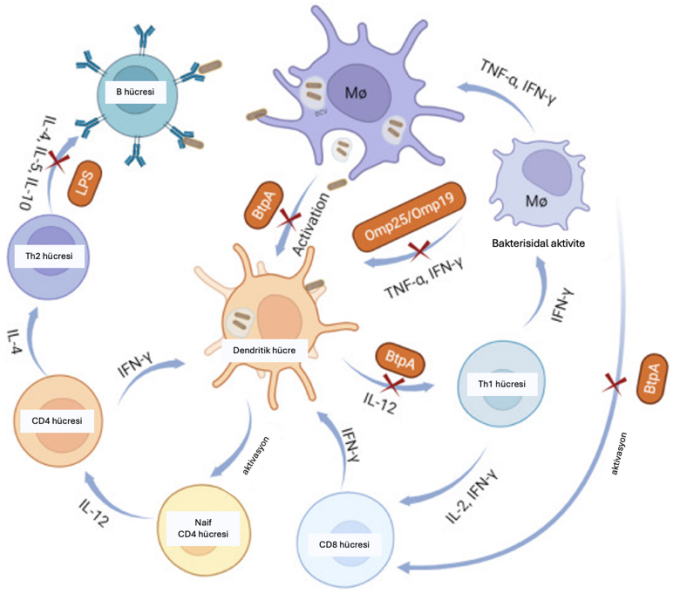
Adaptif bağışıklık, bağışıklık sisteminde enfeksiyonlara karşı uzun süreli bağışıklık geliştiren bir savunma mekanizmasıdır (Chi, Pepper & Thomas, 2024). *Brucella* enfeksiyonu ortaya çıktığında, üç temel mekanizma adaptif immün yanıtı aktive eder (Martirosyan & Gorvel, 2013).

İlk olarak, CD4+/CD8+ T hücreleri IFN-γ üreterek makrofajları aktive eder ve *Brucella*'nın konakçı hücreler içinde çoğalmasını önler. İkinci bir mekanizma, enfekte makrofajları ortadan kaldıran sitotoksik bir etkiye sahip olan CD8+ T hücrelerini içerir. Ek olarak, üçüncü mekanizma, bozulmuş BCV'lerin fagositozunu artıran IgG2a/IgG3 gibi Th1 antikor alt tiplerini içerir. (Grilló, Blasco, Gorvel, Moriyón & Moreno, 2012). Antijen sunan hücreler (APC'ler) *Brucella* antijenlerini tanır ve IL-12 sitokinleri salgılar. Bu sitokinler CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin yanı sıra Th1 ve Th2 yardımcı T hücrelerini aktive eder. Bu hücreler de TNFα, IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ gibi sitokinleri salgılayarak adaptif immün yanıtın düzenlenmesine ve *Brucella*'nın makrofajlar tarafından temizlenmesine yardımcı olur (Ali ve ark 2023), (Martirosyan, Moreno & Gorvel 2011). *Brucella,* konakçıda kalıcı bir enfeksiyon oluşturmak için adaptif immün yanıt üzerinde sürekli olarak immünosupresif etkiler uygular. *Brucella abortus* ile enfekte farelerde, dalakta CD4+ ve CD25+ T

hücrelerinin popülasyonu artmakta ve bu da enfeksiyonun devamlılığında düzenleyici bir rol oynamaktadır (Pasquali ve ark., 2010).

Brucella, DH'leri manipüle ederek doğuştan gelen bağışıklık sinyalinden adaptif bağışıklık sinyaline geçişi engellemek ve böylece konakçı bağışıklığından kaçmak için mekanizmalar geliştirmiştir. (Dudek, Martin, Garg & Agostinis 2013) *Brucella* Omp19 ve Omp25'in TNF-α ve IL-12 sitokinlerinin salgılanmasını azalttığı ve bunun sonucunda DH'ler tarafından T-hücrelerinin aktivasyonunu bozduğu gösterilmiştir. Konağın koruyucu Th1 bağışıklık tepkilerinin başlatılmasındaki bu engel, *Brucella*'ya varlığını etkili bir şekilde gizleme avantajı sağlar. (Avila-Calderón ve ark., 2020) (Martirosyan, Moreno & Gorvel 2011)

Brucella LPS, APC'lerdeki MHC II molekülleri tarafından antijenlerin tanınmasını ve sunumunu bozarak ve B hücreleri tarafından antikor üretimini inhibe ederek konakçı adaptif bağışıklık temizliğinden kaçabilir (Lapaque ve ark. 2006). Son çalışmalar, adaptif bağışıklık yanıtından kaçmada rol oynayan yeni bir efektör olan BtpA'nın fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PI (4,5) P2) veya PI (3,4,5) P3 ile etkileşime girdiğini de ortaya koymuştur. Bu etkileşim, bağışıklık sinapsındaki APC'lerin aktivasyonunu engelleyerek CD8+ T hücrelerinin sitotoksisitesini bozar (Durward, Radhakrishnan, Harms, Bareiss & Magnani, 2012).



Şekil 4. *Brucella* ve adaptif immün yanıtları baskılama mekanizmları (Yang ve ark., 2024 türkçeye çevrilmiştir).

Brucella antijenlerini tanıyan antijen sunan hücreler (APC'ler) IL-12 üretmeye başlarlar. Böylece IL-4 ve IL-10 gibi sitokinleri üreten Th2 yardımcı ve CD4+ T hücrelerini uyarırlar. Bu sitokinler aynı zamanda B hücrelerini aktifleştirerek humoral bağışıklığında aktive olmasına neden olurlar ve enfeksiyonu ortadan kaldırmaya hızlıca başlarlar. APC'ler Th1 yardımcı T hücrelerini de uyarabilirler ve CD8+ T hücrelerinin olgunlaşmasına yardımcı olarak sitotoksik T hücresi (STL) aktifleşmesine yardımcı olabilirler. STL aktivitesi TNF-α, IL-2 ve IFN-γ salgılayarak *Brucella* ile enfekte olan hücreleri tanırlar ve ortadan kaldırmaya başlarlar (Yang, Wang, Hou, Sun, Xia & Wu, 2024) (Şekil 4).

Brucella enfeksiyonunda hem doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hem de adaptif bağışıklık sisteminin inhibisyonu, enfeksiyonun tamamen ortadan kaldırılmasını zorlaştıran bağışıklık sisteminin yetersizliğine neden olabilir (Yang, Wang, Hou, Sun, Xia & Wu, 2024).

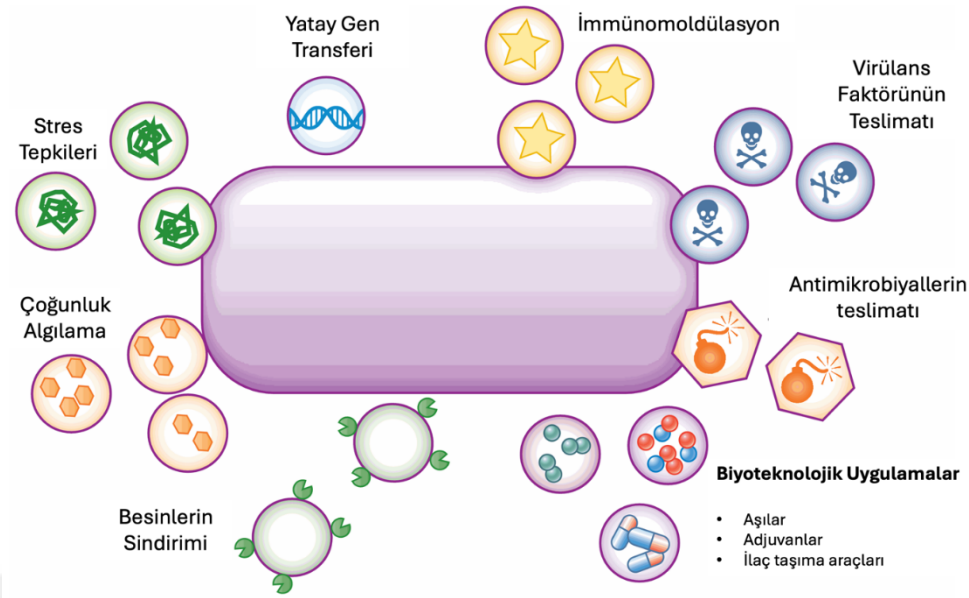
2.7. Bakteriyel Dış Membran Vezikülleri (OMV)

Tüm yaşam formlarında plazma zarı boyunca hücresel bileşenlerin salgılanması organizmaların çevreleriyle etkileşime girmesini sağlayan bir süreçtir. OMV'lerin üretimi 1965 yılında, lizin sınırlayıcı büyüme şartları altında önemli miktarda hücresiz lipopolisakkarit (LPS) salgılayan bir oksotrofik *Escherichia coli* suşunda bildirildi (Bishop, & Work, 1965). Bir başka çalışma ekibi sonrasında elektron mikroskobu salgılanan ve hücre olmayan LPS elemanlarının membran yapısının bir parçası olduğunu gözlemlediler. Bu veziküllerin dış membrandan türetildiğini öne sürdüler (Knox, Vesk, & Work, 1966). Bu gözlemleri takiben bir başka ekip kloramfenikol maruziyetinin ve amino asit açlığının E. coli'de OVM kabarcıklarının üretildiğini gösterdi (Rothfield, & Pearlman-Kothencz, 1969). Sonraki çalışmalarda farklı gram negatif bakteriler ile yapılan deneylerde de OMV'lerin izole edildiğini ve gözlemlendiği raporlandı (Rothfield ve ark., 1969; Mergenhagen, Bladen, & Hsu, 1966; Chatterjee, & Das, 1967). OMV'lerin bu artan kanıtlarına rağmen, birkaç yıl boyunca sadece büyüme sonucunda ya da hücre lizis yan ürünleri olarak kabul edildi. Sonrasında gerçekleşen bir çalışmada akut menenjitli hastalardan elde edilen beyin omurilik sıvısı örneklerinde OMV'lere rastlandı ve bu şekilde OMV'lerin biyogenezisi ve rolleri ilgi görmeye başladı (DeVoe, & Gilchrist, 1975).

Hücreler bu etkileşimi hücre yüzeyindeki lipid zarlarından salgılanan küresel, nano boyutlu yapılar olan veziküller ile sağlamaktadır (Brown, Wolf, Prados-Rosales, & Casadevall, 2015; Deatherage, & Cookson, 2012). OMV'ler 20-300 nm boyutları arasında olan ve bakteri hücreleri için çok yönlü bir salgılama aynı zamanda taşıma mekanizması olarak işlev görür (Guerrero-Mandujano, Hernández-Cortez, Ibarra, & Castro-Escarpulli, 2017). Birkaç farklı türde OMV bileşenleri tanımlanmıştır. Bu bileşenler: lipitler, LPS ve OM proteinlerinin yanı sıra kapsüllenmiş periplazmik içeriği de içermektedir. Bu veziküller içerisinde DNA ve RNA gibi sitoplazmik elementlerin varlığı da gösterilmiştir fakat bu elementlerin OMV'lere paketlenmek üzere periplazmaya nasıl taşındığı tam olarak aydınlatılamamıştır (Blenkiron ve ark, 2016; Dauros-Singorenko, Blenkiron, Phillips, & Swift, 2018).

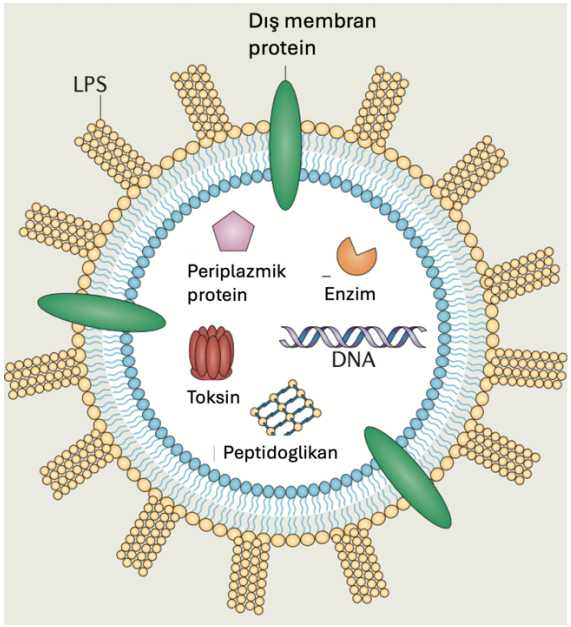
OMV'ler çift katmanlı lipid zar yapılar olarak gözlemlenmektedir. Gram negatif bakteriler tarafından üretilirler (Kulp, & Kuehn, 2010). Aynı zamanda hem patojenik hem de kommensal bakteriler tarafından üretilebilirler (Shen ve ark., 2012). Dış membran veziküllerinin bakteriyel etkileşimi ve DNA, enzim ve protein transferlerinde kolaylık sağlayarak bakterilere avantaj sağladığı ve bakteri topluluklarının hayatta kalıp kendilerini korudukları öne sürülmektedir (Schooling, & Beveridge, 2006; Kadurugamuwa, & Beveridge, 1995; Renelli, Matias, Lo, & Beveridge, 2004). OMV'ler bakteride bulunan biyolojik içeriği içerisinde bulunduran ancak replikasyonsuz bir yapıda bakteriyel 'örnek paketleri' olarak isimlendirilebilir. Ayrıntılı biyokimyasal ve proteomik analizler, dış mebran veziküllerinin lipopolisakkarit (LPS), periplazmik, enzimler, toksinler, DNA, peptidoglikan ve membrana bağlı protein grupları içerdiğini göstermişlerdir (Şekil 6) (Dorward, Garon, & Judd, 1989; Irving ve ark., 2014; Kaparakis ve ark., 2010).

OMV'ler, temel olarak hücre içi ve hücre dışı iletişim, yatay gen transferi, bakteriler arası öldürme, toksin iletimi, polisakkarit hidrolizi ve stres tepkileri dahil olmak üzere bir dizi fizyolojik süreçte rol oynamaktadır (Şekil 5) (Haurat, Elhenawy, & Feldman, 2015; Guerrero-Mandujano ve ark., 2017; Schwechheimer, & Kuehn, 2015).



Şekil 5. Gram negatif bakterilerde dış membran veziküllerinin rolleri (Sartorio, Pardue, Feldman, & Haurat, 2021 türkçeye çevrilmiştir).

Çok sayıda çalışma patojenlerin OMV'leri kullanarak virülans faktörlerini yerel ve uzak lokasyonlardaki konak hücrelerine ilettiğini göstermektedir (Ellis, & Kuehn, 2010).



Şekil 6. Dış membran veziküllerinin içeriği ve yapısı (Kaparakis-Liaskos, & Ferrero, 2015 türkçeye çevrilmiştir).

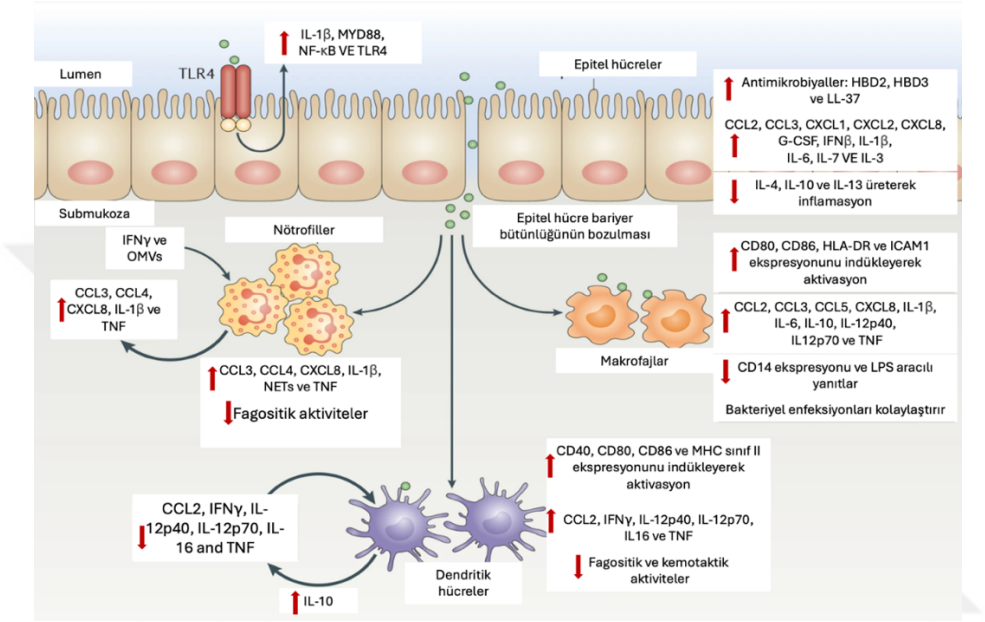
2.7.1. Bakteriyel membran veziküllerinin (OMV) immün sistem etkileri

Dış membran vezikülleri, konak hücrenin doğal ve adaptif bağışıklık tepkisi yollarının önemli aktivatörleridir. Güçlü immünonodülatör molekül LPS'nin yanı sıra OMV'ler OM proteinlerini ve diğer doğal bağışıklık aktive edici ligandları içerirler. Vezikül bileşenleri immün sistem için patojenlerin temizlenmesi adına sistemi uyarabilecek, enfeksiyonun virülans seviyesini arttırabilecek ya da ikisini birden yapabilecek şekilde konak hücre tepkisini düzenler şekilde gözükmektedir. Bunlara ek olarak OMV'lerin immünojenik bu tür özellikleri, aşı amaçları için kullanılabilecek olan koruyucu mukozal ve sistemik bakterisidal antikor tepkilerine yol açabilmektedir (Ellis ve ark., 2010). Kolonize olan bakteriler tarafından üretilen OMV'ler epitel hücreleri ve aynı zamanda makrofajlar ile karşılaşmaktadırlar. Burada bu hücreler tarafından alınıp doğal konak yanıtını tetikleyebilmektedirler. Epitel hücrelerinin ve makrofajların salgılanan bakteri türüne yanıtı, inflamatuar kaskadın bir tetikleyicisidir (Alaniz, Deatherage, Lara, & Cookson, 2007).

OMV'ler, çok çeşitli yüzey bakteriyel antijenleri ve bağışıklık hücreleri tarafından alınmak için optimal bir boyut ile bakterilerin zarfını temsil eder. Bu sistemlerde doğal olarak bulunan Toll benzeri reseptör (TLR) agonistlerinin etkisi ile birlikte birkaç bakteriyel antijenin varlığı, OMV'lere kendi kendine adjuvantlık özellikleri kazandırır. Bu agonistler veya PAMP'ler (Patojenle İlişkili Moleküler Kalıplar), Kalıp Tanıma Reseptörlerinin (PRR'ler) aktivatörleri, OMV'leri konağın ilk savunma hattı olarak işlev gören doğal gelen bağışıklık tepkisinin güçlü itici güçleri haline getirir (Dowling ve ark., 2016). Buna ek olarak birçok farklı çalışma OMV'lerin aşı olarak kullanılmasının uzun süreli hücresel ve humoral immün yanıtı indükleme yeteneklerini vurgulamaktadır (Tan, Li, Huang, & Liu, 2018; Pritsch ve ark., 2016; Bottero ve ark., 2016).

OMV'ler konak hücrenin epitel bariyerini geçtiğinde, makrofajlar, dendritik hücreler ve nötrofiller ile karşılaşmaktadırlar. Bu bağışıklık hücresi popülasyonları ile doğrudan etkileşime girebilmektedirler. OMV yapıları bakteriyel kökenlerine ve virülans faktörlerine göre nötrofil fonksiyonunu farklı şekillerde etkileyebilmektedirler (Şekil 6). Dendritik hücrelerin OMV'ler tarafından modülasyonu sırasında hücrelerin olgunlaşması ve sitokin üretimi gerçekleşmektedir. Salmonella spp. Tarafından izole edilen OMV'ler, dendritik hücrelerde CD86 ve MHC

sınıf II moleküllerinin ekspresyonunu ve TNF ve IL-12 üretimine sebep olmaktadır (Alaniz, Deatherage, Lara, & Cookson, 2007). Tüm bunlara ek olarak OMV'lerin makrofaj aracılı indükleyebileceği mekanizmalar çok çeşitlidir. En önemli etkilerinden biri makrofajlar tarafından pro-inflamatuar sitokin üretimini yönlendirmektedirler (Şekil 7) (Kaparakis ve ark., 2015).



Şekil 7. OMV'lerin epitel ve doğal bağışıklık hücreleri ile etkileşimleri (Kaparakis ve ark., 2015 türkçeye çevrilmiştir).

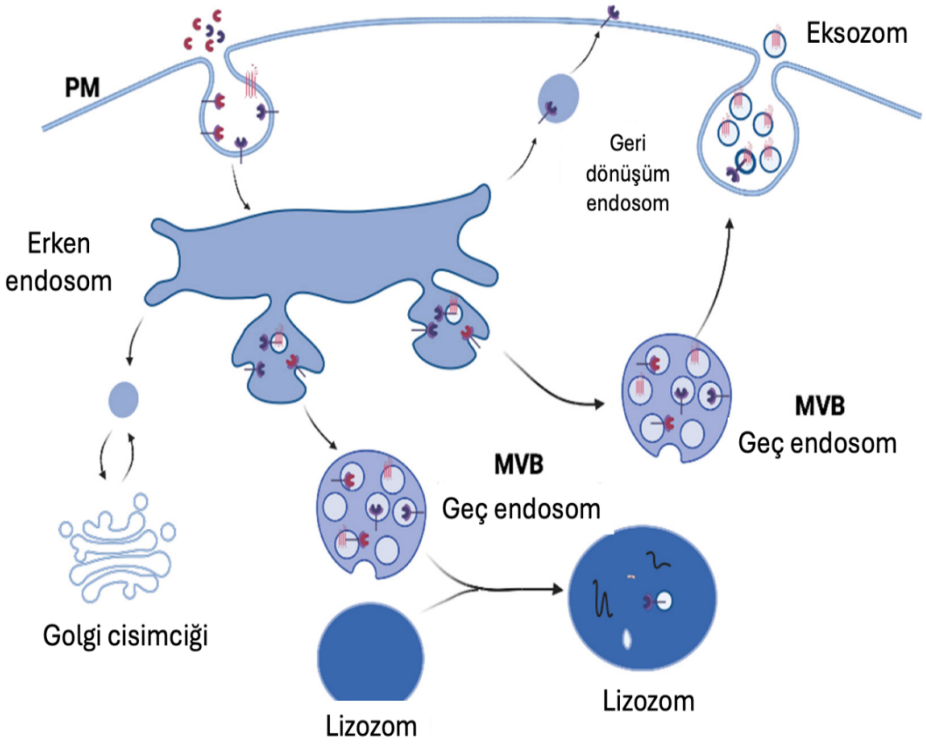
Önceki çalışmalar kapsamında *Brucella* türlerinin dış zar proteinleri, LPS ve diğer bileşenleri içeren OMV'leri kendiliğinden saldığını göstermişlerdir (Gamazo, & Moriyon 1987; Lamontagne ve ark., 2007).

2.7.2. Eksozomlar

Tüm ökaryotik ve prokaryotik hücreler, normal çalışma prensiplerinin bir parçası olarak ve kazanılan anormallikler sırasında hücre dışı veziküller (EV) salgılamaktadırlar. EV'ler genel olarak ektozom ve eksozom olarak ikiye ayrılmaktadır. Ektozom yapıları, plazma membranının dışarıya doğru tomurcuklanması ile oluşan veziküllerdir ~50 nm ile 1 µm çapındadırlar ve büyük veziküller içermektedirler. Eksozom yapıları ile ~40 ila 160 nm (ortalama ~100 nm) çapında endosomal kökene dayanan EV yapılarıdır (Kalluri, & LeBleu, 2020).

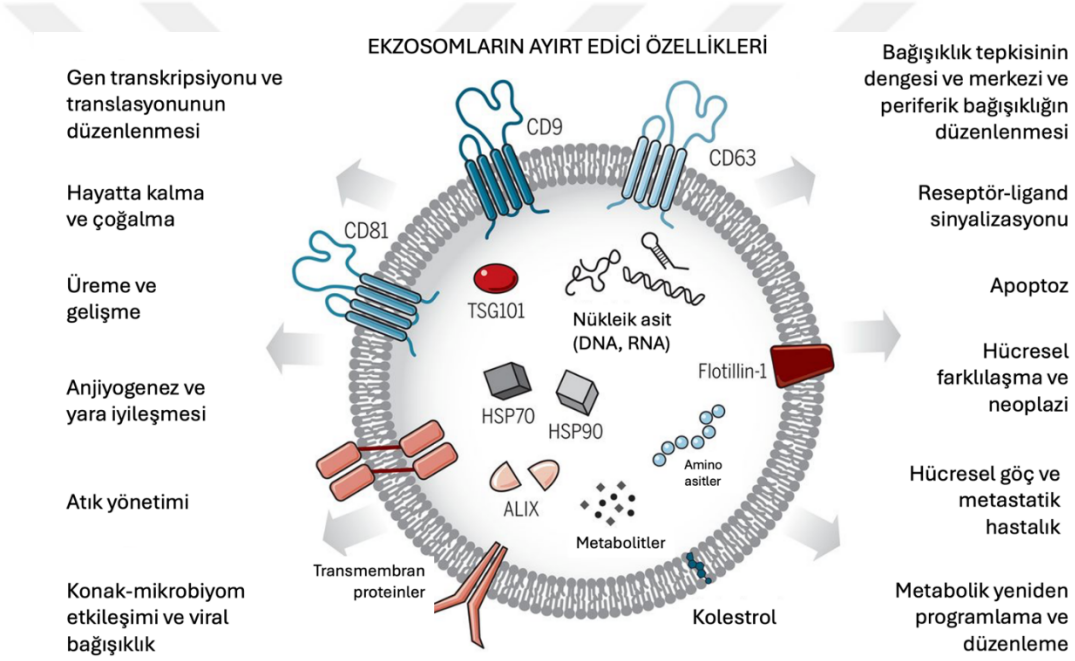
Eksozomlar RNA, DNA, protein ve lipitleri taşıyarak hücresel homeostaziyi

korumak, hücreler ve organlar arasındaki iletişimi kolaylaştırmak gibi hayati işlevlerde görev almaktadırlar. Vücut sıvıları sayesinde hareket ederek moleküler mesajların parakrin, endokrin ve otokrin yollarla iletilmelerini sağlarlar (Krylova, & Feng, 2023). Eksozom biyogenezinin yolağı hücrede moleküler kargonun endositozu ile başlatılır. Membrandan hücre içine tomurcuklanarak ilk vezikül olan erken endozom yapısının oluşturulması sağlanır. Erken endozomun rolü alınan kargonun sınıflandırmasını yapmaktır (Woodman, & Futter, 2008; Grant, Donaldson, 2009). Oluşturulmuş olan bu yapı erken endozom aşamasından sonra üç yol izleyebilmektedir. Geri dönüştürülmesi gereken kargo endosomlarda periferik tübüler alanlara yerleştikten sonra buradan ayrılıp geri dönüşün endosomunda plazma membranı veya golgi ağı ile birleşecektir. Geri dönüşüme gerek olmayan kargolar, erken endosomun merkezi olarak sayılan vakuol bölgeleri üzerinde yoğunlaşacak ve endosomal olgunlaşma yolağına gidip son olarak geç endosomu (MVB) oluşturacaklardır (Şekil 8) (Woodman, ve ark., 2008). Son olarak MVB'ler plazma membranı (PM) ile birleşerek eksozomları serbest bırakacaklardır.



Şekil 8. Eksozom mekanizması (Krylova, ve ark. 2023 türkçeye çevrilmiştir).

Tüm hücreler tarafından salgılanan eksozomlar, üretilen hücre dışı veziküllerdir. Nükleik asitler (DNA ve RNA), lipitler, proteinler ve metabolitler taşımaktadırlar. Sağlık ve hastalık durumunda yakın ve uzun mesafe hücre-hücre etkileşimlerini sağlamaktadırlar ve aynı zamanda hücre biyolojisinin çeşitli yönlerini de etkilemektedirler. Eksozomların membranın lipid bileşimi, üretici hücre tipine bağlı olarak daha fazla kolesterol, sfingolipid ve fosfatidilserin içerir. Membran proteinleri, orijinal hücrelerin tipine ve çevreleyen mikro ortama göre değişebilir. CD9, CD63, CD81 ve EpCAM gibi majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I ve II molekülleri, integrin proteinleri ve tetraspaninler, sırasıyla antijen sunumu, tropizm ve işaretleyici moleküller olarak temel roller oynayan eksozom zarında gözlenir (Şekil 9).



Şekil 9. Eksozom yapısı, içeriği ve işlevleri (Kalluri, ve ark., 2020 türkçeye çevrilmiştir).

Eksozomlar, T hücrelerin ve Doğal öldürücü hücrelerin (NK) aktivasyonu ya da proliferasyonu, bağışıklık baskılanması, antijen sunumu ve anti-inflamatuar süreçler dahil bağışıklık sistemi üzerinde çoğu hücre-hücre etkileşiminde rol oynamaktadır (Tavasolian ve ark., 2021). Bağışıklık hücreleri de diğer hücre grupları gibi kendi özelliklerini çevreye yansıtmak için bağışıklık hücresi işlevlerini otokrin ve parakrin ortamlarda yerine getirebilmek adına mikro bileşenler kullanarak ortam yaratmak için eksozomları kullanmaktadırlar (Arenaccio, ve ark., 2014).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1.Çalışmada kullanılan maddeler;

Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (EUROIMMUN, Almanya);

Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD);

Penisilin-Streptomisin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD);

Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (VivaCell, Sartorius, Almanya);

Gentamisin (Sartorius, Almanya)

Tripan Mavisi (Sigma Aldrich, ABD);

Dimetil Sülfoksit (DMSO) (CDH, Hindistan);

Protein Ladder (cat no: 926-98000, LI-COR, Lincoln, NE, USA);

Dir (floresans 1,1-dioktadesil-3,3,3,3-tetrametilindotrikarbosiyanin iyodür) (İnvitrogen, Thermo Fisher, ABD);

PMA (Forbol 12-Miristat 13- Asetat) (Sigma, MERC, ABD)

3.1.2. Hazırlanan tamponlar ve çözeltiler ve besiyerleri

PBS çözeltisi: 1 paket (10.2g) liyofilize Dulbecco's Tuzlu Fosfatlı Tamponun (Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, PBS) 1000 mL distile su ile çözdürülerek hazırlandı. Otoklav ile sterilizasyonu sağlandı ve +4℃'de saklandı.

%10 FBS RPMI besiyeri: L-glutamin içeren RPMI içerisine, son konsantrasyon %10 olacak şekilde ısı ile inaktive edilmiş Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 oranında penisilin/streptomisin eklendi ve +4℃'de muhafaza edildi.

RPMI besiyeri: L-glutamin içeren RPMI içerisine, son konsantrasyon %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve +4^{o}C'de muhafaza edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. THP-1 hücre hatlarının çoğaltılması

THP-1, akut monosit lösemi hastasından alınan periferik kandan izole edilen bir monosittir. İlgili hücreler son konsantrasyon %10 olacak şekilde ısı ile inaktive edilmiş Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 oranında penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 ortamı ile 37^{o}C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde büyütülmüştür.

Dondurulmuş THP-1 hücre stokları önce 37^{o}C su banyosunda 10-15 sn bekletilip ardından hızlıca tam besiyeri ile al-ver yapılarak 50 mL' lik falkonlara aktarılmıştır.

DMSO'nun olası toksik ve THP-1 hücreleri üzerinde istenmeyen matürasyon yan etkisi düşünülerek santrifüj işlemi (25ºC' de, 5 dakika, 2000 rpm) ile uzaklaştırılması sağlanmıştır. Hücrelerin %80 yoğunluğa ulaşması ile erken pasajlar dondurularak stoklanmıştır. Hücreler çalışılan laboratuvarda optimize edilmiş olan dondurma prosedürüne göre stoklanmıştır (Hücre besiyeri/Fötal Buzağı Serumu/DMSO; 5/4/1; V/V/V). Bu sırada süpernatan da alınarak mikoplazma testi gerçekleştirilmiş ve hücrelerin mikoplazma negatif olduğu da teyit edilmiştir.

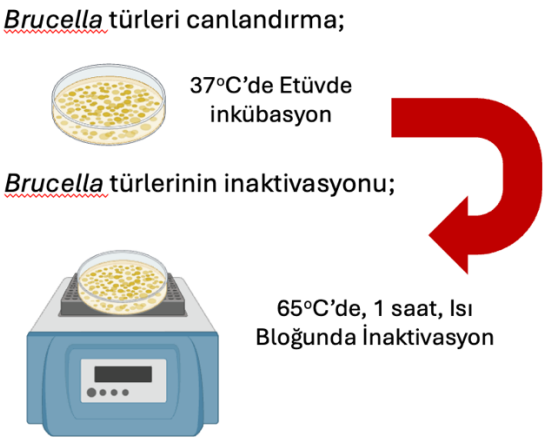
Literatürde pasaj süresinin özellikle THP-1 hücre hatlarının matürasyon düzeyini etkilediğine dair çalışmalar mevcuttur (Chanput, Mes, & Wichers, 2014). Bu sebeple eksozom karakterlerinde oluşabilecek farklılıkların ortadan kaldırılması amacıyla THP-1 hücre hattının pasajlama oranları ve idamesi hassasiyet ile gerçekleştirilmiştir. THP-1 hücre hattının pasajı 1/2 sabit pasajlama oranı ile devam ettirilmiştir.

3.2.2. *Brucella melitensis* (ATCC 234548) ve *Brucella abortus* (ATCC 23450) bakterilerinin üretilmesi

Projemizde kullanılan *Brucella* suşları halk sağlığı kurumundan elde edilmiştir. Çalışmalar uygun biyogüvenlik düzeyi koşullarında yapılmıştır. Standart suşlar *Brucella* agara (BD, Becton Dmckmnson, France) pasajlanmıştır. 37ºC' de 3-5 gün etüvlenerek canlandırılmıştır.

3.2.3. *Brucella melitensis* (ATCC 234548) ve *Brucella abortus* (ATCC 23450) bakterilerinin inaktive edilmesi

B. *melitensis* ve B. *abortus* suşları için ayrı ayrı 0,5 McFarland (1.5x108 coloni forming unit (CFU)/mL) bulanıklığında bakteri süspansiyonu kapaklı cam tüplerde hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonları 65ºC' de 60 dakika ısı bloğunda inaktive edilmiştir. İnaktivasyonu doğrulamak için tüplerdeki bakteriler üç kez 1X PBS ile yıkanmıştır. Ardından tekrar *Brucella* agara pasajlanıp 37ºC' de 3-5 gün etüvlenerek bakterilerin canlılığı kontrol edilmiştir. Bakteriler, üreme olmadığı doğrulandıktan sonra kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 10).

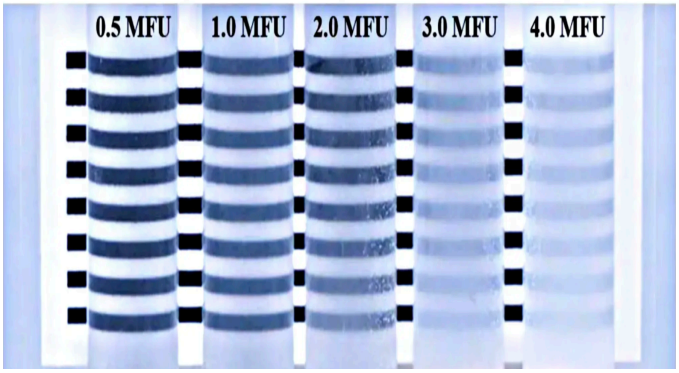


Şekil 10. *Brucella* bakterilerinin canlandırılması ve inaktive edilmesi (biorender kullanılarak oluşturulmuştur).

THP-1 hücre hatları ile *Brucella* bakteri türlerinin muamele edilmesi çalışmalarına başlandığında bakteri sayıları ve THP-1 hücre sayıları belirlendikten sonra bakteri suşlarının üretiminin arttırılması gerektiğine karar verilmiştir. Hesaplamalara göre *Brucella* suşları ayrı ayrı 7 McFarland (21x108 coloni forming unit (CFU)/mL) bulanıklığında yapılmaya başlanmıştır (Tablo 2). Bakteri süspansiyonları yukarıda anlatıldığı gibi inaktive edilerek, inaktivasyonun doğrulanması amacı ile tüplerdeki bakteriler üç kez 1X PBS ile yıkanmıştır. Ardından etüve alınarak bakterilerin canlılığı kontrol edilmiştir. Üreme olmadığı tekrar doğrulandıktan sonra bakteri suşları kullanılmaya başlanmıştır.

Tablo 2. McFarland standartları (Gayathiri, Bharathi, & Priya, 2018 türkçeleştirilmiştir).

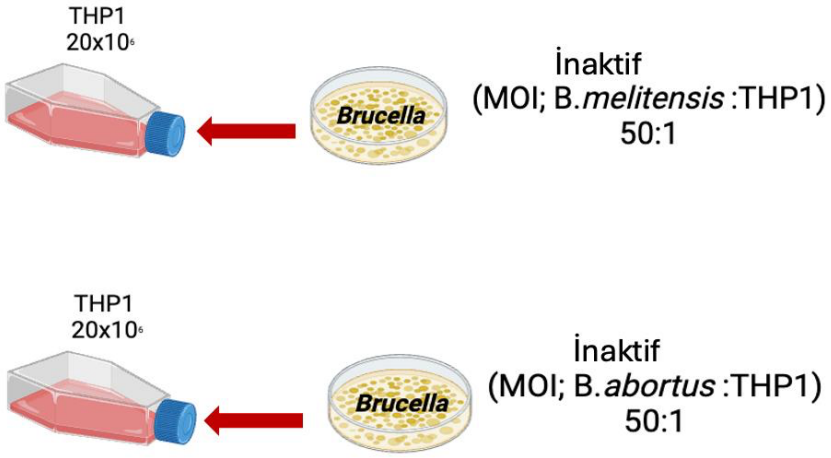
MFU	Yaklaşık Hücre Yoğunluğu
0.5 MFU	1,5 x 10^8 bakteri/ mL
1 MFU	3,0 x 10^8 bakteri/ mL
2 MFU	6,0 x 10^8 bakteri/ mL
3 MFU	9,0 x 10^8 bakteri/ mL
4 MFU	12 x 10^8 bakteri/ mL
5 MFU	15 x 10^8 bakteri/ mL
6 MFU	18 x 10^8 bakteri/ mL
7 MFU	21 x 10^8 bakteri/ mL
8 MFU	24 x 10^8 bakteri/ mL
9 MFU	27 x 10^8 bakteri/ mL
10 MFU	30 x 10^8 bakteri/ mL
* MFU- McFarland Standardı	



Şekil 11. McFarland bulanıklığı bakteri süspansiyonları (McFarland, 1907).

3.2.4. İnaktif *Brucella* suşları ile THP-1 hücre hatlarının muamele edilmesi

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda 50:1 (bakteri:hücre) oranı ile inaktif *Brucella* ve THP-1 hücre hatlarının muamele edilmesine karar verilmiştir (Pollak, Delpino, Fossati, & Baldi, 2012; Yi ve ark., 2021). THP-1 hücre hatları, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ilave edilmiş RPMI 1640 ortamına alınmıştır. THP-1 hücre hatları için sabit hücre sayısı/hacim oranı belirlenmiştir. Bu orana göre THP-1 hücre hatları $1x10^6$ hücre/mL olacak şekilde hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. T75 flasklar için total hacim 20 mL olarak belirlenerek T75'lik flasklara $20x10^6$ hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Ekilen THP-1 hücrelerine 50:1 oranında *Brucella* suşlarının ekimi gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalar yapıldıktan sonra *Brucella* suşları ayrı ayrı THP-1 hücre hatlarına 20 mL için $1x10^9$ olacak şekilde ekimleri yapılmıştır (Şekil 12). THP-1 hücreleri ve inaktif *Brucella* suşlarının ekimi yapıldıktan sonra 48 saat 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.



Şekil 12. B.*abortus* ve B.*melitensis* ile THP-1 hücre hatlarının 50:1 oranında muamele edilmesi (biorender kullanılarak oluşturulmuştur).

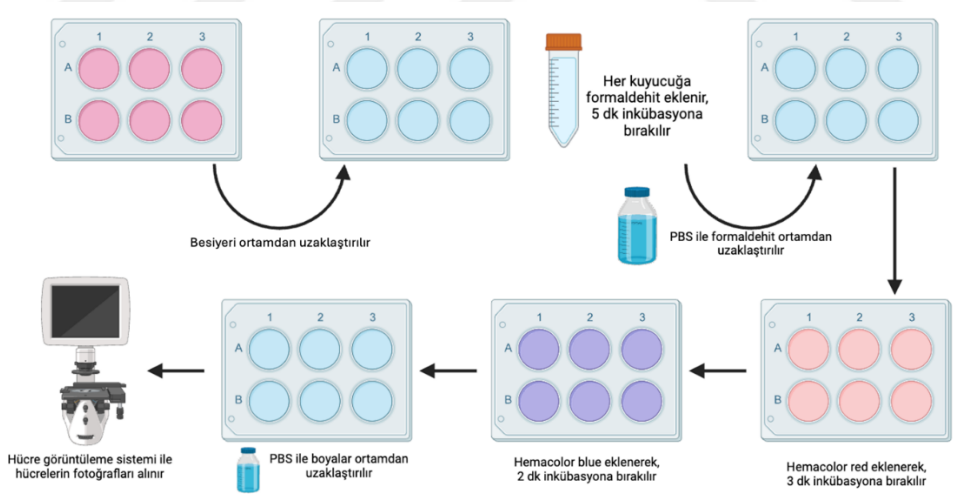
İnkübasyon süresi sonlandığında *Brucella* suşları ile muamele edilen hücreler öncelikle mikroskop altında gözlemlenmiştir. Hücrelerin %60-70 oranında adheran hale geldiği ve morfolojik olarak değiştikleri gözlemlenmiştir (Şekil 25).

İnaktif *Brucella* suşları ile muamele edilmiş THP-1 hücrelerinin inkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra üst fazları toplanmıştır. 2000 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüje tabi tutulan üst fazdan süpernatan kısmı alınarak, sitokin analizleri için -20°C'ye kaldırılmıştır. Ayrıca hücrelerin morfolojik açıdan daha iyi

incelenebilmesi adına T75'lik flasklardaki adheran hale gelen hücre popülasyonu Diff Quick Boyama protokolü ile boyanarak, görüntülemeleri yapılmıştır.

3.2.5. İnaktif *Brucella* suşları ile muamele edilmiş THP-1 hücrelerinin morfolojik analizleri

T75' lik flaskta adheran halde bulunan THP-1 hücreleri 1X PBS ile yıkanmıştır ve bu şekilde besi yeri tamamen ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine %1' lik formaldehit eklenerek flask zeminine iyice yapışmaları sağlanmıştır ve hücreler 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hücreler 2 kere 1X PBS ile yıkanmıştır. Bu şekilde formaldehitin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonrasında hücrelerin üzerine yüzey alanını kaplayacak kadar hemacolor red boyası eklenmiştir ve hücreler 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Yıkama yapılmadan ortama yine bütün yüzey alanını kaplayacak miktarda hemacolor red boyası eklenmiştir ve hücreler 1 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sona erdikten sonra boyalar ortamdan 1X PBS yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Sonrasında hücreler EVOS görüntüleme cihazında analiz edilmiştir (şekil 13).



Şekil 13. Diff quick boyama işlemi ile EVOS hücre görüntüleme sistemi (biorender kullanılarak oluşturulmuştur).

3.2.6. Eksozomların ve dış membran veziküllerinin (OMV) izolasyonu ve karakterizasyonu

3.2.6.1. *Brucella melitensis* (ATCC 234548) ve *Brucella abortus* (ATCC 23450) bakterilerinin üretilmesi

Projemizde kullanılacak olan *Brucella* suşları halk sağlığı kurumundan elde edilmiştir. Çalışmalar uygun biyogüvenlik düzeyi koşullarında yapılmıştır. Standart suşlar *Brucella* agara (BD, Becton Dmckmnson, France) pasajlanmıştır. 37^{o}C'de 3-5 gün inkübe edilerek canlandırılmıştır.

3.2.6.2. İnaktif *Brucella* ile muamele edilen THP-1 hücrelerinden eksozom izolasyonu

Eksozom izolasyonu için eksozom içermeyen besiyeri ortamı hazırlanması: Eksozom çalışmalarında Fetal Sığır Serumu (FBS) kaynaklı olası eksozomların elimine edilmesi gerekmektedir. Bu kapsamda FBS kaynaklı eksozomların ultrasantrifüj yöntemi ile uzaklaştırılarak eksozomdan arındırılmış besiyerinin oluşturulması (eksozom içermeyen FBS) sağlanmıştır. Yapılan ilk denemede FBS tek başına çevrildiğinde oluşan eksozom pelletinin çok büyük olması ve üst fazda kalan FBS alınırken bu eksozom pelletinin yoğunluğu sebebi ile FBS'yi tekrar kontamine edebileceği endişesi yaşanarak farklı bir strateji uygulanmaya başlanmıştır. THP-1 hücre hattının büyütüldüğü %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren besiyeri ultrasantrifüj yöntemi ile çevrilerek üst kısmı alınmıştır. Besiyerinde %10 oranında şeyreltilmiş halde bulunan FBS'in ultrasantrifüj sonrası eksozomlardan daha güvenli şekilde uzaklaştırıldığı ve böylece eksozom kontaminasyon riskinin azaltıldığı değerlendirilerek bu strateji ile çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir. Daha uzun sürede besi yeri eldesi dezavantajına sahip olmasına rağmen bu yöntemin daha güvenli olduğu belirlenmiştir. Bu yöntem ile eksozom içermeyen hücre besi yeri elde edilmiştir. Tüm santrifüj ve çözelti elde işlemleri steril koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Eksozom içermeyen besiyeri (%10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ilave edilmiş RPMI 1640) 2HR +4^{O}C' de 100.000xg' de ultrasantrifüj aşamasından sonra 0,22 μm'lik filtreden geçirilerek elde edilmiştir.

THP-1 hücre çoğalma kinetiklerini karşılaştırmak amacıyla hücreler n=3 olacak şekilde farklı besiyeri koşullarına maruz bırakılmıştır:

1. %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin RPMI 1640 ortamı (Tam besi yeri)
2. %1 penisilin/streptomisin ilave edilmiş RPMI 1640 ortamı (FBS içermeyen

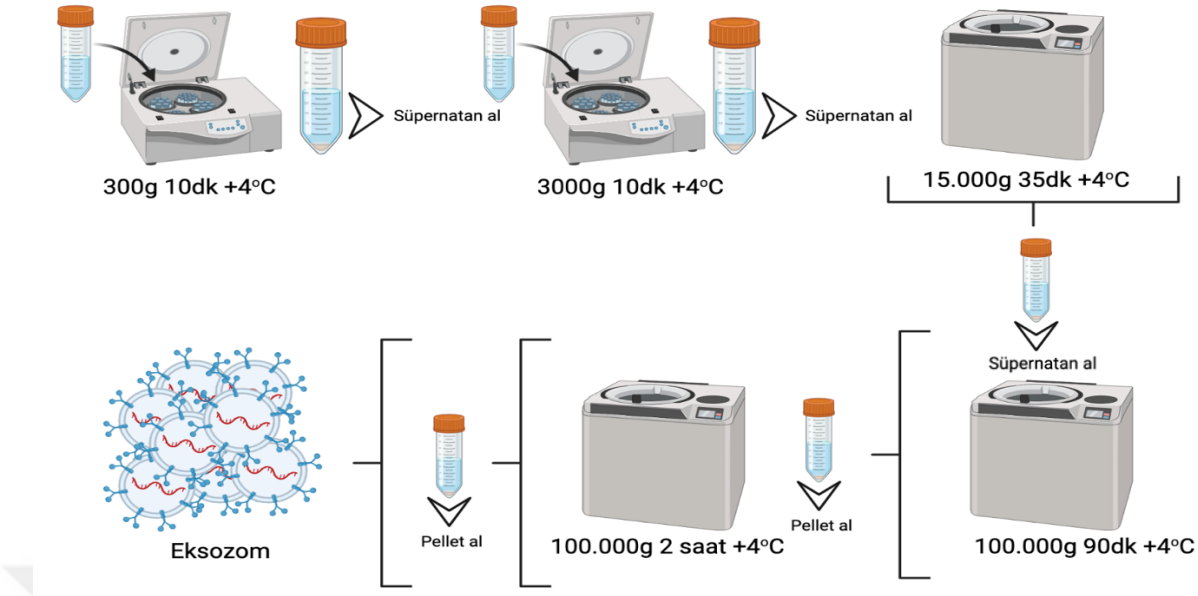
besi yeri)

3. Eksozomsuz Besiyeri (%10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ilave edilmiş RPMI 1640 ortamının, ultrasantrifüj ile eksozomlardan arındırılmış versiyonu).

THP-1 hücre hattı farklı besi yeri koşullarına ekilmeden önce $5x10^6$ hücre/5 mL olacak şekilde sayılmış. Daha sonrasında 1X PBS ile 25°C'de, 5 dakika, 2000 rpm'de 2 kez yıkanmıştır. Daha sonrasında hücre sayılarının karşılaştırılması için 3 farklı koşul (tam besi yeri, FBS içermeyen besi yeri, eksozomsuz besiyeri) besi yerine $5x10^6$ hücre/5 mL ve her besiyeri için 3 adet T25'lik flask olacak şekilde ekimleri yapılmıştır. Ekimleri yapılan hücre hatları 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 48 saat inkübe edilmiştir. 48. saatin sonunda hücreler sayılmıştır.

THP-1 hücre hatlarından ultrasantrifüj yöntemi ile eksozomların elde edilmesi: THP-1 hücre hatları $40x10^6$ hücre/40 mL (2 adet T75'lik flask) olacak şekilde ekilmiştir. Hücre kültür koşullarının 48. saatinde inkübasyon sonlandırılarak flasklardaki besiyeri ve hücreler 50 mL'lik falkonlara alınarak buza gömülmüştür. Örnekler önceden soğutularak +4°C'ye getirilen santrifüjde 2000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüjlenmiştir. Süpernatan kısmı soğuk zinciri bozmayacak şekilde temiz bir 50 mL'lik falkona alınmıştır. Sonrasında eksozom protokolüne başlanarak öncelikle 10 dk 300xg'de santrifüjleme gerçekleştirilmiş ve sonrasında süpernatan kısmı tekrar temiz bir 50 mL'lik falkona alınmıştır. Ardından 10 dk boyunca 3.000xg'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatan alınarak, otoklavlanmış ultrasantrifüj tüplerine 33 mL'e 1X PBS ile tamamlanarak aktarılmıştır. Bu aşamada 2 adet $20x10^6$ hücre'lik debrislerinden arındırılmış eksozom izolasyonuna hazır süpernatan bulunmaktadır. Örnekler rotoru ve kendisi önceden +4°C'ye soğutulan ultrasantrifüjde çalışılmaya devam edilmiştir. Ultrasantrifüj cihazında 70Ti sabit açılı rotorda (Becman Coulter, ABD) 35 dakika boyunca 15.000xg'de santrifüjleme yapılarak süpernatan kısımları toplanmıştır. Süpernatanlar otoklavlanmış yeni ultrasantrifüj tüplerine alınmıştır.

Tüplerin koyulduğu sıradaki pozisyonu ve pelletin beklendiği yer tüpün dışından çizilerek alan belirlenmiştir. 90 dakika boyunca 100.000xg'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası pellet kısmı alınarak, 33 mL PBS ile yine 100.000xg'de 2 saat santrifüjlenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 13). Süpernatan atılarak örnekler gerekli miktarda PBS ($40x10^6$ hücre eksozomu için 250 µL) ile konsantre edilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Ultrasantrifüj yöntemi ile eksozom izolasyonu aşamaları (biorender kullanılarak oluşturulmuştur).

THP-1 hücre hattından elde edilen eksozomların miktarının Bikinkoninik Asit Tahlili (Bicinchoninic Acid Assay, BCA) yöntemi ile belirlenmesi: Elde edilen örneklerden protein miktarını tayin etmek için Bikinkoninik Asit Protein Tayin Yöntemi (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, cat no:23225) kullanılmıştır. BCA kitindeki albümin protein standardı 2000 µg/mL'dir. Bu konsantrasyondan 1.95 µg/mL olacak şekilde seri dilüsyonlar yapılmıştır ve toplamda 11 adet standart (S1-S11) ve blank koşulları oluşturulmuştur (S1: 2000; S2: 1000; S3: 500; S4: 250; S5: 125; S6: 62.5; S7: 31.25; S8: 15,62; S9: 7,81; S10: 3,91; S11: 1,95 ug/mL). THP-1 hücre hattından elde edilen eksozomlardan 25 µL olacak şekilde örnek kuyulara eklenmiştir. Tüm standart ve örnekler iki tekrarlı (duplike) çalışılmıştır. Kitin içerdiği solüsyonlar önerilen miktarda (50:1 Reagent A: Reagent B) hazırlanmıştır. Örnekler ve standartların üzerine Reagent A+Reagent B çözeltisinin eklenmesi 96 kuyucuklu hücre kültür plakasında gerçekleştirilmiştir. Alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan koruma sağlanmıştır. 37°C'de karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası absorbans değerleri kitin içeriğinde yazana göre 562 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Seri dilüsyon ile elde edilen standartlar kullanılarak R2 hesaplanmış ve standart eğri grafiği çizilmiştir.

İnaktif *Brucella* suşları ile muamele edilen THP-1 hücre hattından eksozom izolasyonu: THP-1 hücre hattı ile ultrasantrifüj eksozom izolasyon optimizasyonları

tamamlandıktan sonra THP-1 hücre hatlarına $80x10^6$ hücre/80 mL olacak şekilde 50:1 (bakteri: hücre) inaktif B. *abortus* ve inaktif B. *melitensis* ekimleri yapılmıştır. Her bakteri suşu için 4 adet T75'lik flask ekimi yapılmıştır. Hücreler flasklara ekildikten sonra inaktif bakteri suşları ayrı ayrı THP-1 hücre hatlarının üzerine eklenmiştir. Bu aşamalarda ekim yapılırken hücre ortamı olarak eksozom içermeyen besiyeri kullanılmıştır. İnaktif *Brucella* suşları ile muamele edilen THP-1 hücre hatları 48 saat 37^{o}C'de %5 CO^2'li inkübatörde inkübe edilmiştir.

48. saatin sonunda örnekler soğutularak +4^{o}C'ye getirilen santrifüjde 2000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüjlenmiştir. Sonrasında eksozom protokolüne başlanarak öncelikle 10 dk 300xg'de santrifüjleme gerçekleştirilmiş ve sonrasında süpernatan kısmı tekrar 50 mL'lik falkona alınmıştır. Ardından 10 dk boyunca 3.000xg'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatan alınarak, otoklavlanmış ultrasantrifüj tüplerine 33 mL'e 1X PBS ile tamamlanarak aktarılmıştır. Bu aşamada 4 adet $20x10^6$ hücre'lik debrislerinden arındırılmış B. *abortus* ile muamele edilen THP-1 ve 4 adet $20x10^6$ hücre'lik debrislerinden arındırılmış B. *melitensis* ile muamele edilen THP-1 süpernatanı bulunmaktadır. Örnekler rotoru ve kendisi önceden +4^{o}C'ye soğutulan ultrasantrifüjde çalışılmaya devam edilmiştir. Ultrasantrifüj cihazında 70Ti sabit açılı rotorda (Becman Coulter, ABD) 35 dakika boyunca 15.000xg'de santrifüjleme yapılarak süpernatan kısımları toplanmıştır. Süpernatanlar otoklavlanmış yeni ultrasantrifüj tüplerine alınmıştır. Tüplerin koyulduğu sıradaki pozisyonu ve pelletin beklendiği yer tüpün dışından çizilerek alan belirlenmiştir. 90 dakika boyunca 100.000xg'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası $80x10^6$ hücre'lik inaktif B. *abortus* ile muamele edilen THP-1 ve $80x10^6$ hücre'lik inaktif B. *melitensis* ile muamele edilen THP-1 eksozom pelletleri 500 µL'de resüspanse edilmiştir. Aynı ultrasantrifüj aşamaları kontrol olarak kullanılması adıyla inaktif *Brucella* suşları ile muameleye maruz kalmamış THP-1 hücre hattı için de tekrarlanmıştır. Yıkama aşamasından önce örneklerin protein miktarını tayin etmek için Bikinkoninik Asit Protein Tayin Yöntemi (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, cat no:23225) kullanılmıştır. Kitin içerdiği solüsyonlar önerilen miktarda (50:1 Reagent A: Reagent B) hazırlanmıştır. Örnekler ve standartların üzerine Reagent A+Reagent B çözeltisinin eklenmesi 96 kuyucuklu hücre kültür plakasında gerçekleştirilmiştir. Alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan koruma sağlanmıştır. 37^{o}C'de karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir.

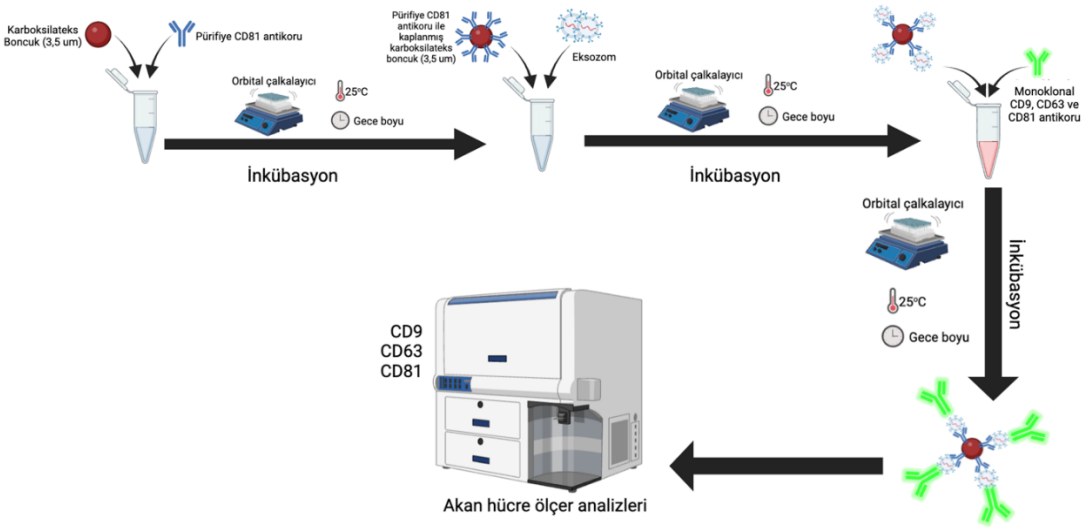
İnkübasyon sonrası absorbans değerleri kitin içeriğinde yazana göre 562 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Seri dilüsyon ile elde edilen standartlar kullanılarak R2 hesaplanmış ve standart eğri grafiği çizilmiştir (Şekil 30) (Tablo 3).

3.2.6.3. Western Blot analizleri ile eksozomal proteinlerin gösterilmesi

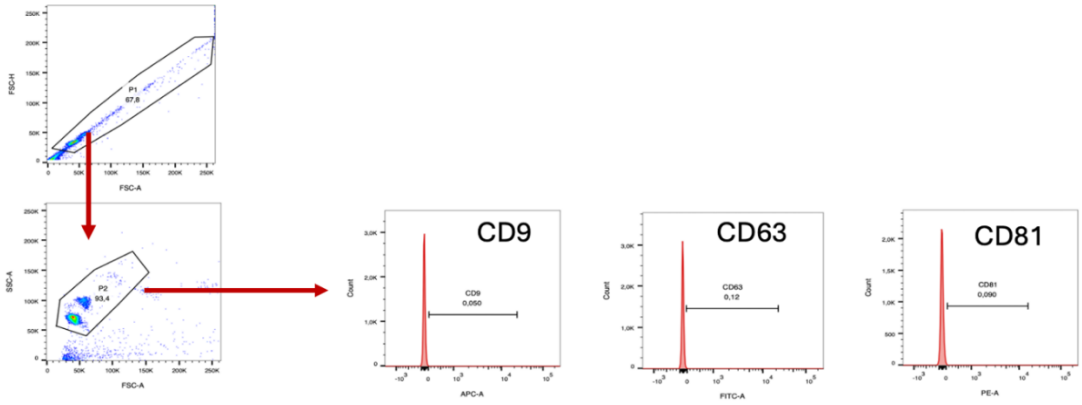
Eksozom örnekleri RIPA çözeltisi kullanılarak +4ºC, 15.000xg, 15 dakikada eksozomal proteinler elde edilmiştir, (6X) loading buffer ile karıştırılmıştır. 95ºC'de 5 dakika bekletilen örnekler, kuyucuklara yüklenmeye hazır şekle getirilmiştir. Bu aşamadan sonra SDS-PAGE aşamasına geçilmiştir. Protein Ladder (cat#926-98000, LI-COR, Lincoln, NE, USA) kullanılarak kuyucuk başına 10 µl örnek jele yüklenmiştir. Sonraki aşamada Running Buffer kullanılmıştır ve SDS-PAGE yürütme cihazı (Clever Scientific, Warwickshire, UK) 100 voltda 1,5 saat çalıştırılmıştır. Proteinlerin düzgün bir şekilde yürüdüğünden emin olunduktan sonra sistem durdurulmuştur ve jel, PVDF membrana transfer aşaması için hazır hale getirilmiştir. PVDF membran uygun boyutlarda kesilmiştir. %100 etanol (EtOH) ile aktifleştirilmesi sağlanmıştır. Transfer modülü kaset şeklinde olduğundan sırasıyla, filtre kağıdı, PVDF membran, SDS-PAGE jeli, transfer kağıdı ile kapatılıp, cihaz elektrotlarına bağlanmıştır. Clever Science Semi-Blot transfer cihazı (Warwickshire, United Kingdom) sabit 12 voltda 1 saat çalıştırılmıştır. PVDF membrana geçmeyerek SDS-PAGE jelinde kalan proteinlerin görüntülenebilmesi adına Coomasive Blue kullanılmıştır. PVDF membran, %5 Bovine Serum Albumin (BSA) içeren WB yıkama solüsyonu TBS-T (tris-buffer saline-tween20) içerisinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılarak bloke edilmiştir. Membran uygun dilüsyonda hazırlanarak anti CD81 primer antikoru ile +4oC'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon bittikten sonra membran TBS-T ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkamalar tamamlandıktan sonra HRP konjuge edilmiş sekonder antikor uygun dilüsyonda ortama eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. ECL substratını membrana uygulanarak, kemilüminesans dedektörü ile sinyal yakalanmış ve görüntülemeler yapılmıştır.

Eksozomların akan hücre ölçer cihazı (AHÖ) ile tetraspaninlerinin analizi: Eksozomların akan hücre ölçer cihazında görünürlüğünü sağlayabilmek adına karboksilateks boncukların (3,5 µm, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) eksozom

spesifik antikorla kaplanması yapılmıştır. Burada kullanılan antikor pürüfiye monoklonal anti-CD81 antikoru olarak belirlenmiştir. Ayrıca her 10 boyama için 1 µL karboksilateks boncuk kullanılmıştır. Karboksilateks boncuklar ile seçilen antikorların konjuge edilebilmesi için önce oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübe edilen antikor ve karboksilateks boncuklar sonrasında orbitral çalkalayıcı cihazında bir gece oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bittikten sonra santrifüj işlemi gerçekleştirilip süpernatanı atılmış ve %5'lik BSA eklenerek oda sıcaklığında 4 saat orbital çalkalayıcı da inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası süpernatanı atılmış ve boncuklar %1'lik BSA ile resüspanse edilerek anti-CD81 antikorlarıyla kaplanmış boncuklar elde edilmiştir. Elde edilen CD81 kaplı boncuklar ile eksozomların kaplanma işlemi için 5 ug eksozom örneğine 1 uL boncuk eklenmiştir. Elde edilen boncuk ve eksozom karışımı 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sonrasında bir gece oda sıcaklığında orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe işlemi başlamıştır. Santrifüj edilen örnekler 1X PBS ile resüspanse edilmiştir. Örnekler boyama işlemi ve akan hücre ölçer analizleri için hazır hale gelmiştir (şekil 15). Eksozomların boyamaları CD9 APC (cat#312108, BioLegend, USA), CD63 FITC (cat#MA1- 19602, Invitrogen), CD81 PE (cat#349506, BioLegend, USA) antikorları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 1 saat oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edilen örnekler akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir (Şekil 16).



Şekil 15. Karboksilateks boncukların eksozomlar ile kaplanması (biorender kullanılarak oluşturulmuştur).



Şekil 16. Karboksilateks boncuklara bağlanan eksozomlar için kapılama stratejisi (Otofloresan).

3.2.6.4. Canlı B*rucella* suşlarından dış membran vezikülü (OMV) izolasyonu

Canlı Brucella türlerinden membran vezikülü izolasyonu için EXOBACTERİA OMV ISOLATİON KİT (Cat No: EXOBAC100A-1) kullanılmıştır. Ek olarak kit daha önce sadece E.*coli* bakterilerinden denendiğinden pozitif kontrol olarak E.*coli* bakterileri de kullanılarak deney tasarlanmıştır. Öncelikle canlı bakteri kültürlerinden üst sıvılarının toplanması gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle bakteriler uygun koşullarda kültüre edilerek canlandırılmıştır. Daha sonrasında bakteri türleri 4oC'de 20 dakika boyunca 5000xg'de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı yeni bir tüpe aktarılarak bakteri kalıntılarını tamamen gidermek amacıyla 4ºC'de 20 dakika boyunca 5000xg'de tekrar santrifüj edilmiştir. Kültür üst sıvısı toplanarak 0,45 µm vakum filtresinden geçirilmiştir. Filtreleme adımı 0,22 µm vakum filtresiyle tekrarlanarak materyal toplanmıştır. Toplanan kültür sıvısı bu şekilde membran vezikülü izolasyonu için hazır hale getirilmiştir. Daha sonrasında kolon hazırlama ve dış membran vezikülü (OMV) yakalama aşamalarına geçilmiştir. Burada kitin içerisinden çıkan kolona 1 mL OMV Bağlayıcı Reçine pipetlenmiştir. Sonrasında kolona 10 mL 1X Bağlayıcı Tampon (1X Binding Buffer) eklenerek ortam dengelenmiştir ve çözeltinin tamamen akmasını sağlanmıştır. Aşağıya akan akıntı ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kolonun altına kitin içerisinden çıkan sarı kolon tıpası yerleştirilmiştir. Reçineye 30 mL berraklaştırılmış bakteri kültürü üst sıvısı eklenmiştir ve kolonun üstüne kolon kapağını yerleştirilmiştir. Kolonlar, OMV bağlanmasına izin vermek için 4ºC'de 30 dakika boyunca dönen bir rafta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonlandıktan sonra kolon bir rafa yerleştirilerek kolonun üst ve alt kapakları açılmıştır. Reçine/süpernatan karışımının akmasına izin verilmiştir. Karışım aktıktan sonra kolon 15 mL Bağlayıcı

Tamponla yıkanmıştır. Akan kısmı atılmıştır ve yıkama adımı iki kez tekrarlanmıştır. Kolon alttan tıpa ile kapatılarak 1,5 mL OMV Elüsyon Tamponu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir. Her 30 saniyede bir kolon hafifçe sallanmıştır. Kolonun alt kapağını açılarak OMV'leri içeren elüat yeni bir mikro santrifüj tüpüne toplanmıştır. Daha sonra örneklerin protein miktarlarını tayin etmek için BCA kiti (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, cat no:23225) kullanılmıştır.

3.2.6.5. Canlı Brucella suşlarından dış membran vezikülü (OMV) karakterizayonu

Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS) sistemi ile dış membran veziküllerinin analiz edilmesi: B. melitensis OMV ve B. abortus OMV örnekleri qNano Exoid (Izon Biosciences, New Zealand) cihazı ile Exoid Control Suite (Izon Biosciences, New Zealand) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. TRPS analizi sırasında üretici firma tarafından eksozom/membran vezikülü çalışmalarında kullanılması tavsiye edilmiş olan NP150 isimli nanopor (Izon Biosciences, New Zealand) kullanılmıştır. OMV örnekleri (1X) PBS ile süspanse edilmiştir. Daha sonra sistemin alt haznesine (1X) PBS, üst haznesine ise 40 µl OMV örneği eklenmiştir. Okuma işlemi 47 mm'lik nanopor gerginliği, 700 mBar basınç ve 0,47 mV voltaj referans değerleri ile başlanmıştır, okumanın durumuna göre gerekli düzenlemeler gerçekleştirilmiştir. Okuma işlemi 500 adet parçacık sayısına ulaşılana kadar devam ettirilmiştir. Burada elde edilen değerler boyut için nA bozulma ve konsantrasyon için dakikadaki parçacık sayısı olduğu için gerçek boyut ve konsantrasyon değerlerine üretici firma tarafından önerilen CPC100 isimli karboksillenmiş polistren kalibrasyon boncuklarının (Izon Biosciences, New Zealand) aynı cihaz ayarlarında okutulması ile ulaşılmıştır. Okumalar tamamlandıktan sonra sonuçlar Izon Data Suite (Izon Biosciences, New Zealand) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.7. Elde edilen eksozomların ve dış membran veziküllerinin (OMV'lerin) işaretlenmesi

Eksozom ve OMV izolasyonu sırasında örnekleri işaretlemek adına Dir (floresans 1,1-dioktadesil-3,3,3,3-tetrametilindotrikarbosiyanin iyodür, cat no: D12731, Thermo Fisher, ABD) boyası THP-1 hücre hatlarında denenmiştir. THP-1 hücre hattında akan hücre ölçer analizleri ile belirlenen Dir ile işaretleri THP-1 eksozomları için uygulanan

protokol aynı şekilde inaktif B. abortus ve inaktif B. melitensis ile muamele edilmiş THP-1 hücrelerinin eksozomları ve canlı B. abortus ve canlı B. melitensis için de uygulanmıştır. Çalışmamızda Bikinkoninik Asit Protein Tayin Yöntemi (BCA) ile belirlenen eksozom konsantrasyonlarına göre hesaplamalar yapılarak her eksozom ve OMV koşulundan 500 µg eksozom/OMV alınmıştır. Örneklerden belirlenen miktarda alınarak her örneğe final konsantrasyonu 5 µM olarak hazırlanan Dir boyasından 100 µL/0.5 µL boya olacak şekilde eklenmiştir, 30 dakika boyunca 37^{o}C'de karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonra erdikten sonra ultrasantrifüj tüplerine alınan örnekler 33 mL'e PBS ile tamamlanmıştır. 100.000xg'de 2 saat santrifüjlenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 17). Süpernatan atılarak örnekler 500 µg/500 µL olacak şekilde konsantre edilmiştir.



Şekil 17. Dir ile resüspanse edilmiş THP-1 hücre hattı eksozom pelleti.

Yapılan çalışmalar ile THP-1 hücre hattından eksozom izolasyonu, inaktif B.*melitensis* ve B.*abortus* ile muamele edilen THP-1 hücre hatlarından eksozom izolasyon optimizasyonları ve canlı *Brucella* türlerinden dış membran vezikülü izolasyonları tamamlanmıştır.

3.2.8. THP-1 hücre hattından izole edilen bakteri kaynaklı eksozomlar ve canlı *Brucella* kaynaklı bakteriyel membran vezikülleri ile THP-1 hücrelerinin muamele edilmesi

3.2.8.1. Dir boyası ile işaretlenmiş inaktif *Brucella* suşlarına maruz bırakılmış THP-1 kaynaklı eksozomlarının ve canlı *Brucella* suşlarından izole edilen OMV'lerin THP-1 hücre hattı ile hücre kültürü

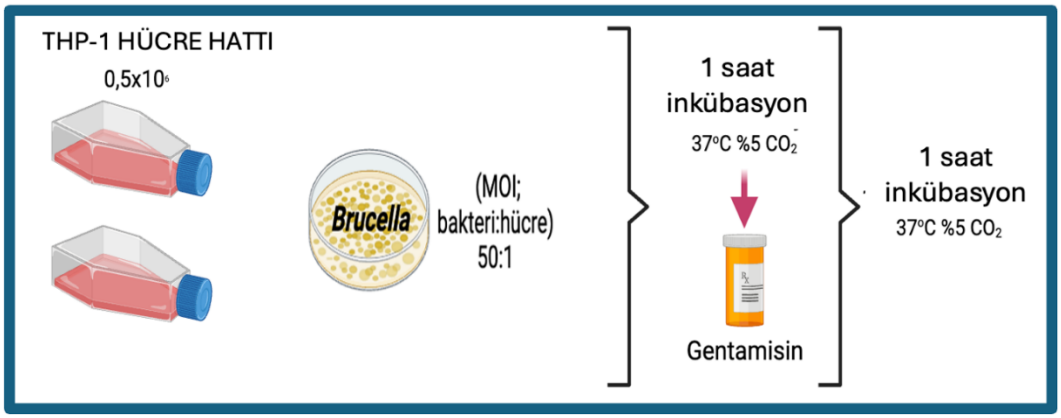
BCA sonuçlarına göre ayarlanan ug/mL eksozom ve OMV miktarlarına göre $6x10^4$/200 µL THP-1 hücrelerine 20 µg olacak şekilde eksozom muamelesi

yapılmasına karar verilmiştir. Dir boyası ile eksozomların işaretlenip işaretlenmediği anlayabilmek adına farklı koşullar oluşturulmuştur. Bu koşullar:

1. THP-1 hücre hattı (negatif kontrol),
2. Dir ile inkübe edilen THP-1 hücre hattı (pozitif kontrol),
3. İnaktif B. *abortus* ile muamele edilen THP-1 hücre hattı,
4. İnaktif B. *melitensis* ile muamele edilen THP-1 hücre hattı,
5. Dir boyası ile işaretlenmiş İnaktif B. *abortus* ile muamele edilen THP-1 hücrelerinden sekrete edilen eksozomlar (20 μg) ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı,
6. Dir boyası ile işaretlenmiş İnaktif B. *melitensis* ile muamele edilen THP-1 hücrelerinden sekrete edilen eksozomlar (20 μg) ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı,
7. Canlı B. *abortus* ile muamele edilen THP-1 hücre hattı,
8. Canlı B. *melitensis* ile muamele edilen THP-1 hücre hattı,
9. Dir boyası ile işaretlenmiş Canlı B. *abortus* kaynaklı dış membran vezikülleri (OMV) (20 μg) ile muamele edilen THP-1 hücre hattı,
10. Dir boyası ile işaretlenmiş Canlı B. *melitensis* kaynaklı dış membran vezikülleri (OMV) (20 μg) ile muamele edilen THP-1 hücre hattı,

Not: Her koşul n=3 olacak şekilde tekrarlanmıştır.

Yapılan literatür taramaları sonucunda kültür ortamında THP-1 hücre hattı içine alımı gerçekleşmeyen canlı *Brucella* türlerinin ortamdan elimine edilmesi adına gentamisin kullanılması gerektiğine karar verilmiştir (Pollak, Delpino, Fossati, & Baldi, 2012; Delpino, Fossati, & Baldi, 2009). Burada gentamisinin hücreler üzerindeki etkisini anlamayabilmek adına hücreler ve canlı *Brucella* türleri yukarıda belirtilen koşullara ek olarak aynı zamanda canlı B. *abortus* ile muamele edilen THP-1 hücre hattı ve canlı B. *melitensis* ile muamele edilen THP-1 hücre hattı olarak kültür koşullarında ekimi yapılarak 1 saat 37^{o}C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücrelere 100 μg/mL olacak şekilde gentamisin eklenmiştir (Şekil 18).



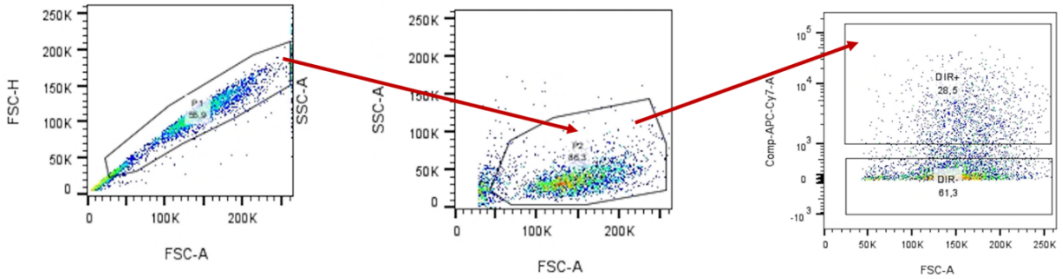
Şekil 18. *Brucella* bakteri türleri için gentamisin kullanımı (biorender kullanılarak oluşturulmuştur).

Koşullar oluşturulduktan sonra hücreler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48. saatin sonunda akan hücre ölçer analizleri yapılmıştır (Şekil 18). Akan hücre ölçer analizlerinde makrofaj polarizasyonunun incelenmesi amaçlanmıştır. Burada hücre yüzey reseptörlerinin tespiti adına kullanılacak antikorlar: CD14, CD80, CD86, HLA-DR, CD163, CD169 ve CD206 olarak belirlenmiştir.

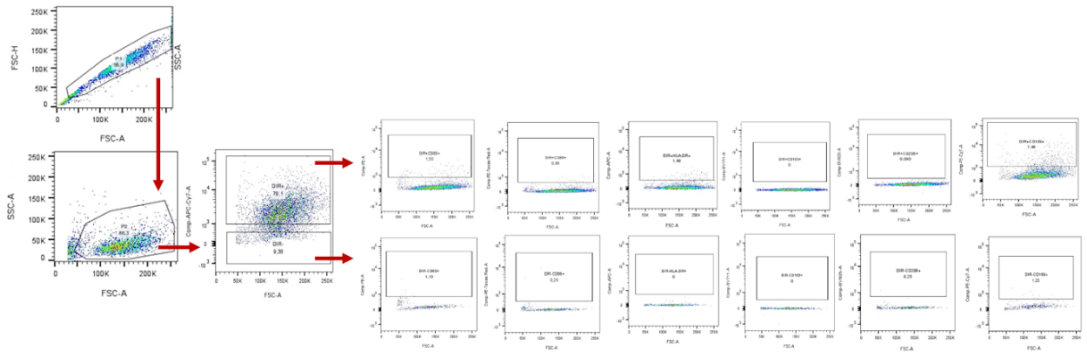
Yapılan çalışmalarda inaktif *Brucella* bakterileri, inaktif Brucella kaynaklı THP-1 eksozomları ve THP-1 hücre hattı ile gerçekleştirilen koşullar hem LPS (*Escherichia coli*'den lipopolisakkarit, cat no: 93572-42-0, Sigma Aldrich, ABD) varlığında hem de LPS yokluğunda akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir.

3.2.8.2. Dir boyası ile işaretlenmiş farklı *Brucella* türlerine maruz bırakılmış THP-1 kaynaklı eksozomların ve canlı *Brucella* kaynaklı OMV'lerin THP-1 hücre hattı ile hücre kültüründen akan hücre ölçer analizleri

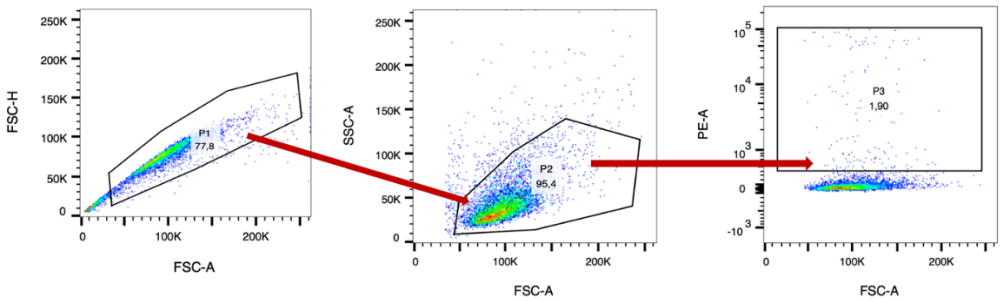
Hücrelerin 37°C'de 48 saat inkübasyonu sonrasında 96 kuyucuklu plakadan akan hücre ölçer tüplerine toplanmıştır. Toplanan hücrelerin kapılama stratejileri belirlenerek akan hücre ölçer cihazında analizleri yapılmıştır (Şekil 19).



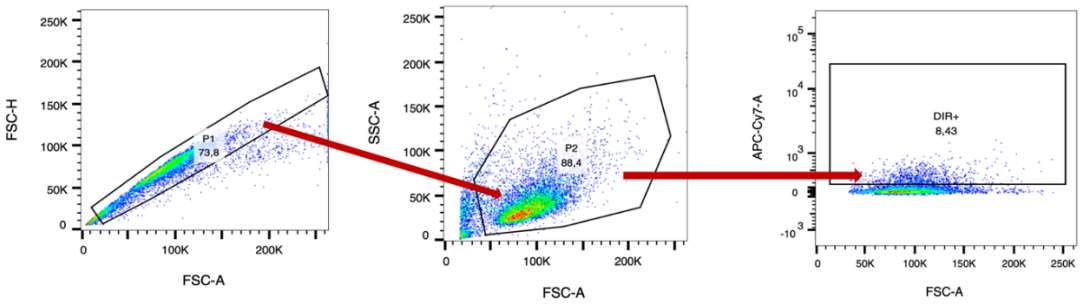
Şekil 19. İnaktif *Brucella* suşları kaynaklı THP-1 hücre hattından elde edilen Dir boyası ile işaretlenmiş eksozomların THP-1 hücre hattı ile muamele edilmesi sonrası akan hücre ölçer analizleri kapılama stratejisi.



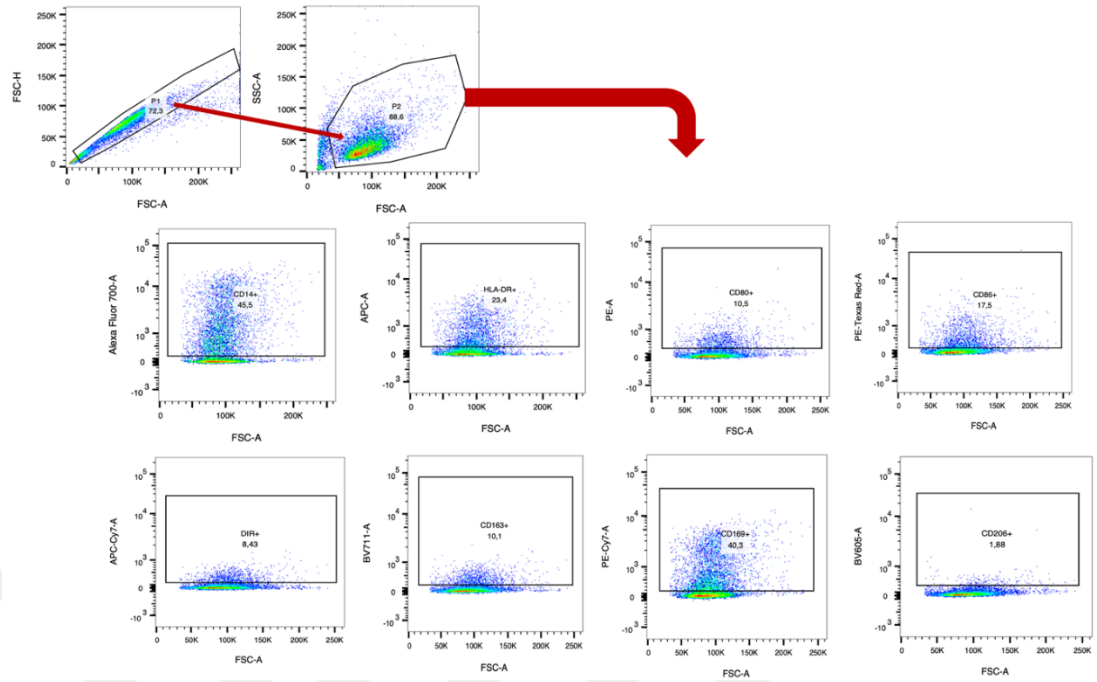
Şekil 20. İnaktif *Brucella* suşları kaynaklı eksozomlar ile muamele edilmiş THP-1 hücre hatlarının yüzey belirteçlerinin akan hücre ölçer analizleri için kapılama stratejisi.



Şekil 21. Canlı *Brucella* suşları ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hatlarının canlılık analizleri için akan hücre ölçer kapılama stratejisi.



Şekil 22. Canlı *Brucella* suşlarından izole edilen dış membran veziküllerinin (OMV) Dir boyası ile işaretlenmesi ve THP-1 hücre hattı ile muamele edilmesi sonrası akan hücre ölçer analizleri kapılama stratejisi.



Şekil 23. Canlı *Brucella* suşlarının dış membran vezikülleri (OMV) ile muamele edilmiş THP-1 hücre hatlarının yüzey belirteçlerinin akan hücre ölçer analizleri için kapılama stratejisi.

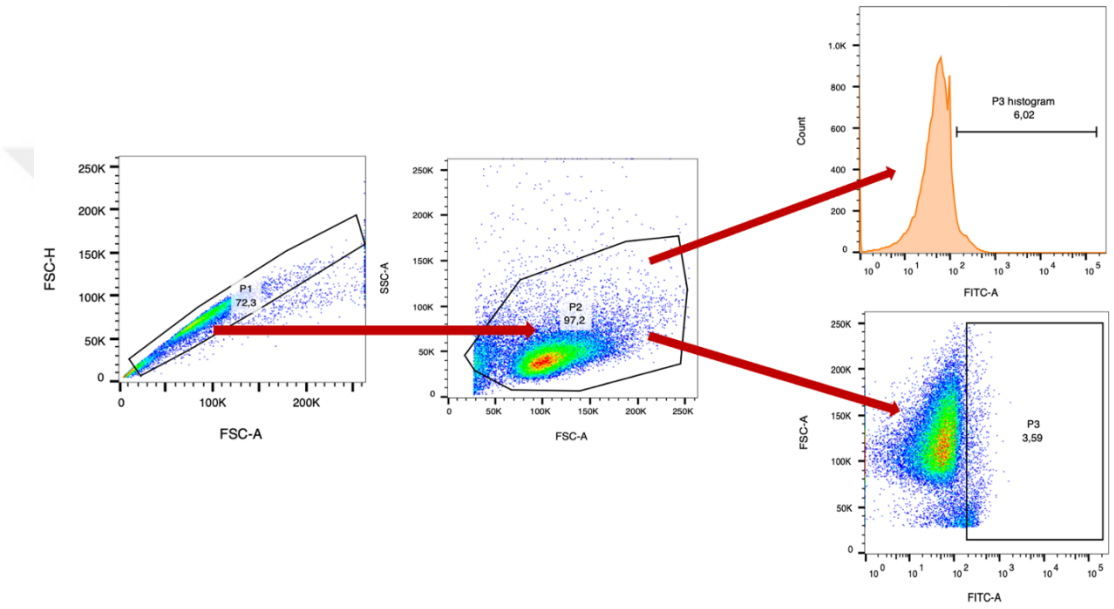
3.2.9. Hücre içi Nitrik Oksit (NO) ve Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) akan hücre ölçer cihazında analiz edilmesi

Farklı *Brucella* türlerine maruz bırakılmış THP-1 kaynaklı eksozomların ve canlı *Brucella* kaynaklı OMV'lerin THP-1 hücre hattı ile muamele edilmesinden sonra THP-1 hücrelerinin NO/DAF-DA (4,5-Diaminofluorescein diacetate solüsyon, cat no: D225, Sigma Aldrich, ABD) ve ROS/C-DCFDA (2′,7′-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, cat no: D6883, Sigma Aldrich, ABD) akan hücre ölçer analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.9.1 Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) üretim analizi

Hücreler kültür ortamından kaldırıldıktan sonra 5 dakika boyunca 1800 rpm'de oda sıcaklığında santifüj edilmiştir. Santrifüj sonlandıktan sonra pellet serumsuz RPMI ile resüspanse edilmiştir. Tüm koşullar için akan hücre ölçer tüpleri isimlendirilerek PMA (Forbol 12-Miristat 13- Asetat, Sigma, ABD) eklenmeyecek koşullar için resüspanse edilen hücreler 100'er µl akan hücre ölçer tüplerine dağıtılmıştır. Her tüpe 1µl C-DCFDA eklenmiştir. Sonrasında hücreler karanlık ortamda 37°C' de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüm deney tüpleri ışıktan korunarak buza gömülmüştür. Hücrelere 1X PBS eklenerek 1800 rpm' de 4°C' de 5 dakika boyunca

santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra pellet 150 µL 1X PBS ile resüspanse edilmiştir. Tekrar buza gömülerek, ısı ve ışıktan korunarak akan hücre ölçer cihazında analizleri gerçekleştirilmiştir. PMA eklenecek koşullar için tüplere 1µL PMA eklenmiştir. 37ºC'de 25 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üzerlerine PBS eklenerek 1800 rpm'de oda ısısında 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Pellet 150 µL 1X PBS'de resüspanse edilmiştir. Tekrar buza gömülerek, ısı ve ışıktan korunmuştur akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir (Şekil 24).

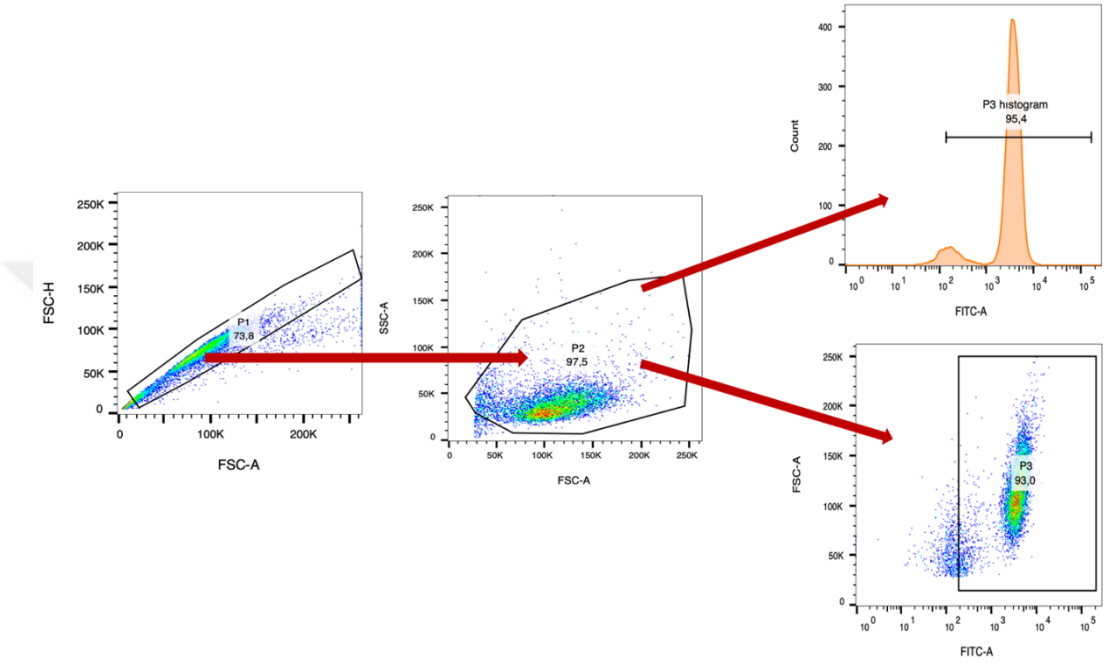


Şekil 24. ROS akan hücre ölçer analizleri kapılama stratejisi.

3.2.9.2. Nitrik oksit (NO) üretim analizi

Hücreler kültür ortamından kaldırıldıktan sonra 5 dakika boyunca 1800 rpm' de oda sıcaklığında santifüj edilmiştir. Santrifüj sonlandıktan sonra pellet serumsuz RPMI ile resüspanse edilmiştir. Tüm koşullar için akan hücre ölçer tüpleri isimlendirilerek PMA eklenmeyecek koşullar için resüspanse edilen hücreler 100'er µL akan hücre ölçer tüplerine dağıtılmıştır. Her tüpe 10 µL DAF-DA eklenmiştir. Sonrasında hücreler karanlık ortamda 25°C' de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüm deney tüpleri ışıktan korunarak buza gömülmüştür. Hücrelere 1X PBS eklenerek 1800 rpm' de 4°C' de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra pellet 150 µL 1X PBS ile resüspanse edilmiştir. Tekrar buza gömülerek, ısı ve ışıktan korunarak

akan hücre ölçer cihazında analizleri gerçekleştirilmiştir. PMA eklenecek koşullar için tüplere 1uL PMA eklenmiştir. 25°C' de 25 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üzerlerine PBS eklenerek 1800 rpm'de oda ısısında 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Pellet 150 µL 1X PBS'de resüspanse edilmiştir. Tekrar buza gömülerek, ısı ve ışıktan korunmuştur akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir (Şekil 25).

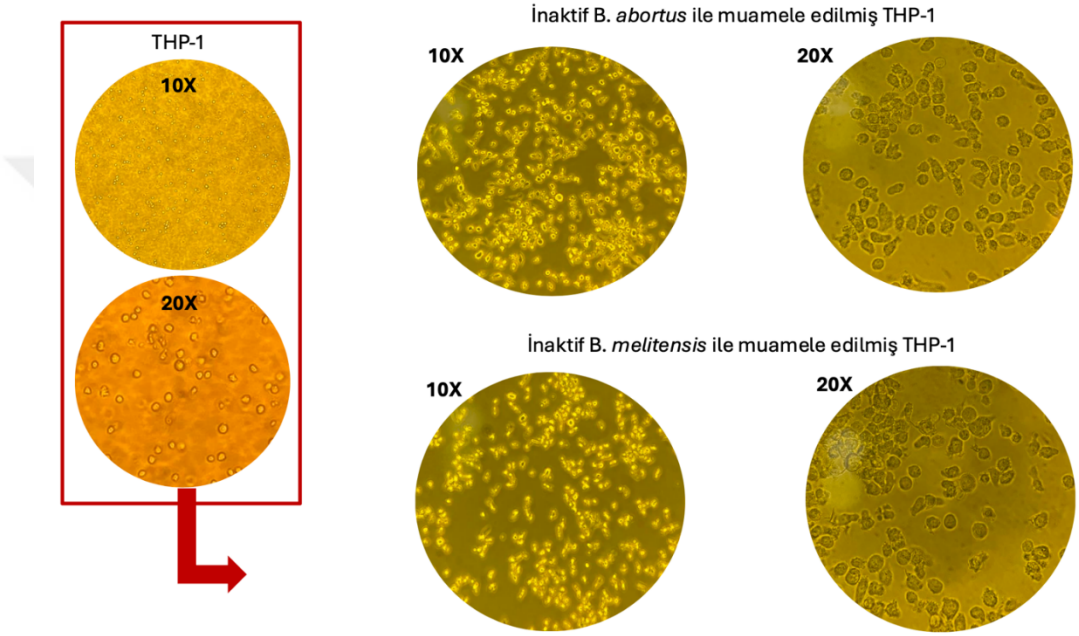


Şekil 25. NO akan hücre ölçer analizleri kapılama stratejisi.

4. BULGULAR

4.1. İnaktif *Brucella* Suşları ile THP-1 Hücre Hatlarının Muamele Edilmesi

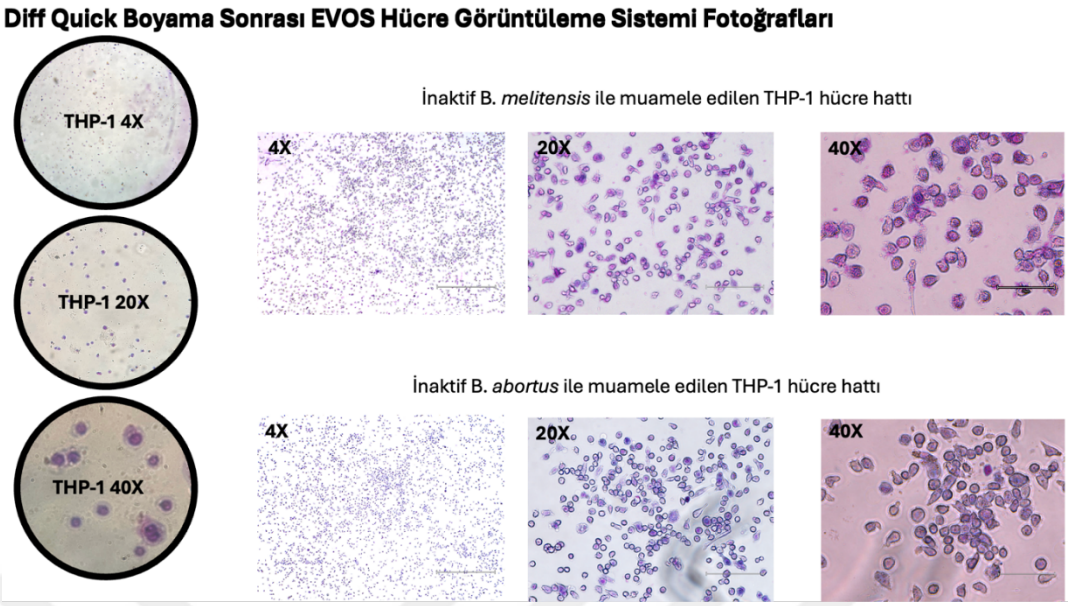
Yapılan hücre kültürü çalışmaları sonucunda inaktif *Brucella* türleri ile muamele edilen THP-1 hücre hatlarının inkübasyon süresi sonlandıktan sonra morfolojik yapılarına bakıldığında THP-1 hücrelerinin %60-70 oranında adheran hale geldikleri ve morfolojik olarak yapılarının makrofaj hücrelerine benzer hale geldiği ve iğsi bir görüntü oluşturdukları gözlemlenmiştir (Şekil 26).



Şekil 26. İnaktif *Brucella* suşları ile muamele edilen THP-1 hücre hatlarının mikroskop görüntüsü.

4.2. İnaktif *Brucella* Suşları ile Muamele Edilen THP-1 Hücre Hattının Diff Quick Boyaması

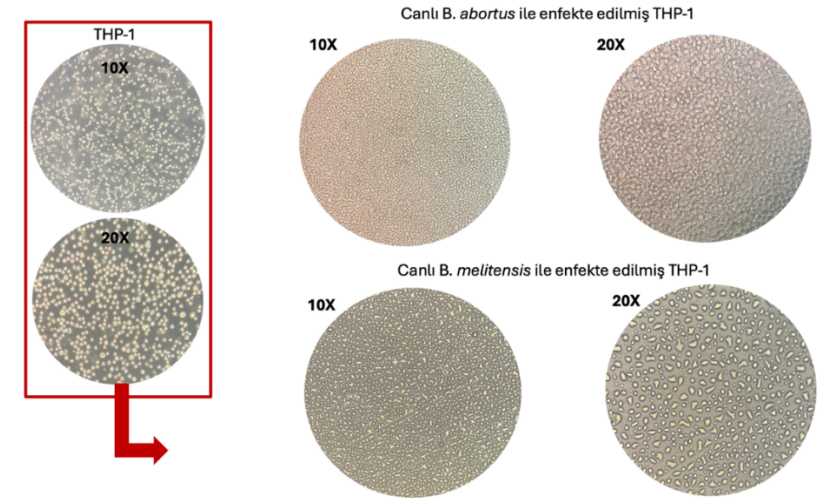
Morfolojik yapılarının inaktif *Brucella* türleri ile muamele edilmesinden sonra değiştiği görülen THP-1 hücre hatlarının daha belirgin bir şekilde görüntülenebilmesi için hücrelere Diff Quick Boyama protokolü uygulanmıştır. Bu görüntüleme sonucunda hücrelerin morfolojik olarak monositik bir hücre grubundan çıktığı ve makrofaj benzeri bir yapıda yüzeye yapıştıkları ve adheran hale geldikleri aynı zamanda yapılarının monosit grubundaki gibi yuvarlak bir morfolojiden çıktıkları ve iğsi bir morfolojiye bürünmeye başladıkları gözlemlenmiştir (Şekil 27).



Şekil 27. İnaktif *Brucella* suşları ile muamele edilmiş THP-1 hücre hatlarının Diff Quick boyama sonrası EVOS Hücre Görüntüleme sistemi fotoğrafları.

4.3. Canlı *Brucella* Suşları ile THP-1 Hücre Hatlarının Muamele Edilmesi

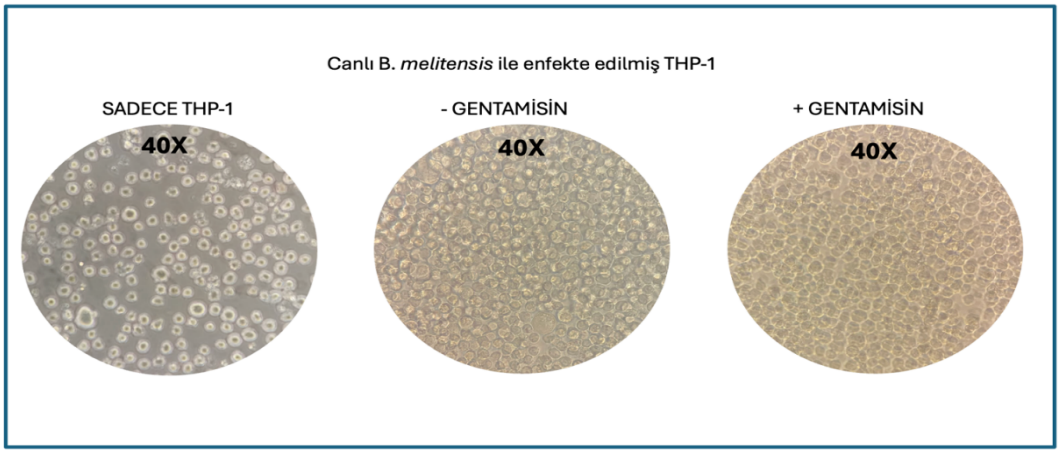
Canlı *Brucella* türleri ile enfekte edilen THP-1 hücre hatlarının morfolojik yapıları incelendiğinde THP-1 hücre hattının hücre kültürü ortamında kültür yoğunluğunun inaktif *Brucella* türlerine oranla daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Canlı B.*abortus* bakterisinin THP-1 hücre hattının yoğunluğu üzerinde daha fazla artışa sebep olduğu görüntülenmiştir (Şekil 28).



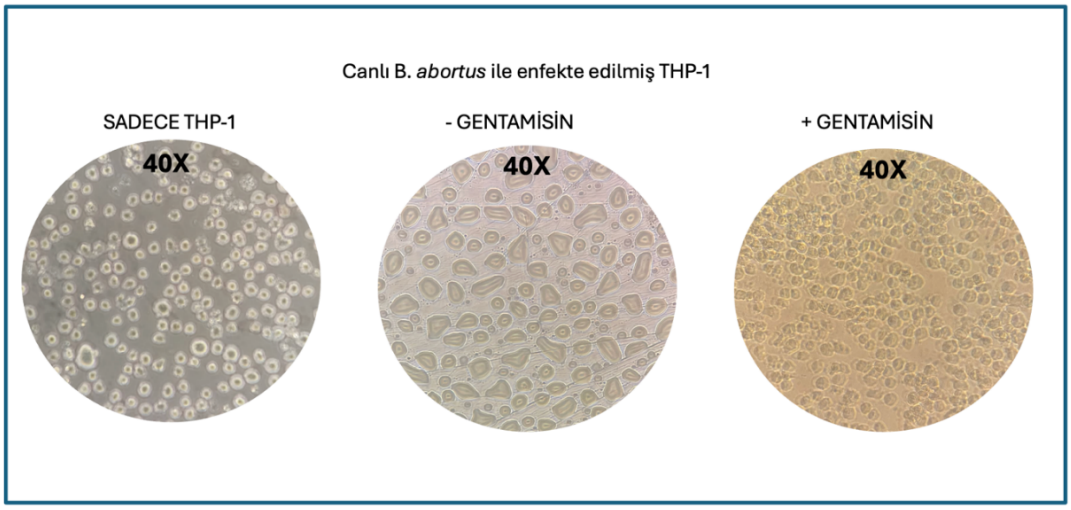
Şekil 28. Canlı *Brucella* suşları ile enfekte edilen THP-1 hücre hatlarının mikroskop görüntüsü.

4.4. Canlı *Brucella* Suşları ile Enfekte Edilen THP-1 Hücre Hatlarının Gentamisin ile Muamele Edilmesi

Canlı *Brucella* türleri ile enfekte edilen THP-1 hücre hatlarına kültür ortamında gentamisin antibiyotiği eklenerek hücreler aynı koşullara maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak B.*melitensis* bakterisi için gentamisin antibiyotiğinin etkisi morfolojik olarak bir farklılık göstermemiş olmakla birlikte, B.*abortus* bakterisi için gentamisin antibiyotiğinin varlığı ve yokluğu arasındaki morfolojik olarak incelendiğinde gentamisin yokluğundaki hücre grubunda yoğunluğun azaldığı ve adheran hale gemiş olsalarda ortamdaki bakterilerin varlığının devam etmesi sebebi ile morfolojik olarak iğsi yapı oluşturamadıkları ve yüzeye tek tek yapıştıkları görülmüştür (Şekil 29 ve 30).



Şekil 29. Canlı B.*melitensis* ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hattının mikroskop görüntüsü.

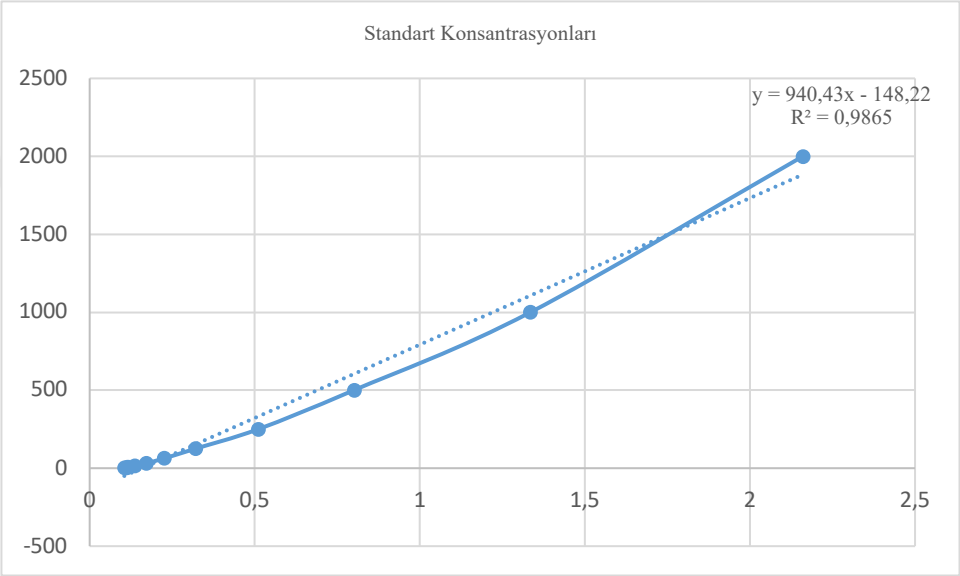


Şekil 30. Canlı B.*abortus* ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hattının mikroskop görüntüsü.

4.5. İnaktif *Brucella* Türleri Kaynaklı THP-1 Eksozomlarının Karakterizasyonu

4.5.1. THP-1 hücre hattından elde edilen eksozomların miktarının Bikinkoninik Asit Tahlili (Bicinchoninic Acid Assay, BCA) yöntemi ile belirlenmesi

THP-1 hücre hattından izole edilen eksozomların BCA kiti ile standart değerleri kullanılarak bir standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 31). Bu eğri sonucunda THP-1 hücre hattından elde edilen eksozom miktarı 1 mL'de 1898,1 ug olarak belirlenmiştir (Tablo 3).



Şekil 31. BCA analizi için standartlar kullanılarak hesaplanmış standart eğri.

Tablo 3. THP-1 hücre hattından elde edilen eksozomların miktarları.

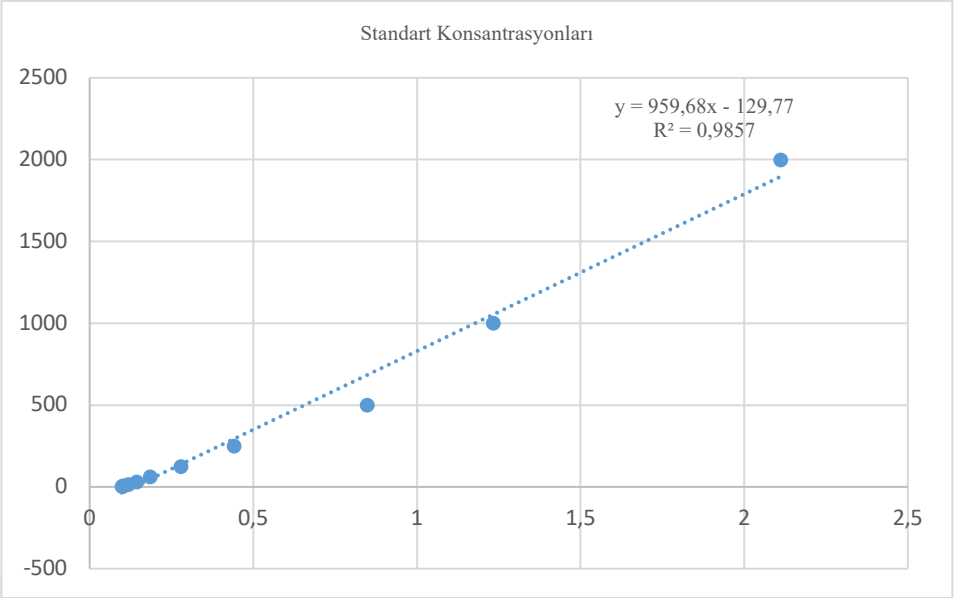
	THP-1 eksozomu (250 uL)
Santrifüj sonrası eklenen total hacim	250 uL
ug/mL	1898,15
Total eksozom miktarı	474,54

4.5.2. İnaktif *Brucella* suşları ile muamele edilen THP-1 hücre hattından eksozomların Bikinkoninik Asit Tahlili (Bicinchoninic Acid Assay, BCA) yöntemi ile belirlenmesi

THP-1 eksozomlarının BCA kiti ile konsantrasyonları belirlendikten sonra inaktif *Brucella* türlerine maruz bırakılmış THP-1 hücre hattından kaynaklı eksozomların BCA kiti ile konsantrasyonları belirlenmiştir (Tablo 4). Kitteki standart değerleri kullanılarak, standart eğri grafiği oluşturulmuştur (Şekil 32). Elde edilen standart eğri grafiği sonucundan inaktif B. *abortus* kaynaklı THP-1 eksozom konsantrasyonu 1886,7 ug/mL, inaktif B. *melitensis* kaynaklı THP-1 eksozom konsantrasyonu 2022,7 ug/mL ve THP-1 eksozom konsantrasyonu 2393,3 ug/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 4. Eksozomların BCA analizi için standart değerleri ve konsantrasyonları.

Standart	Konsantrasyonları
2,11	2000
1,233	1000
0,8465	500
0,4405	250
0,2775	125
0,185	62,5
0,143	31,25
0,1175	15,62
0,1025	7,81
0,1	3,905
0,098	1,9525



Şekil 32. Eksozomların BCA analizi için standartlar kullanılarak hesaplanmış standart eğri.

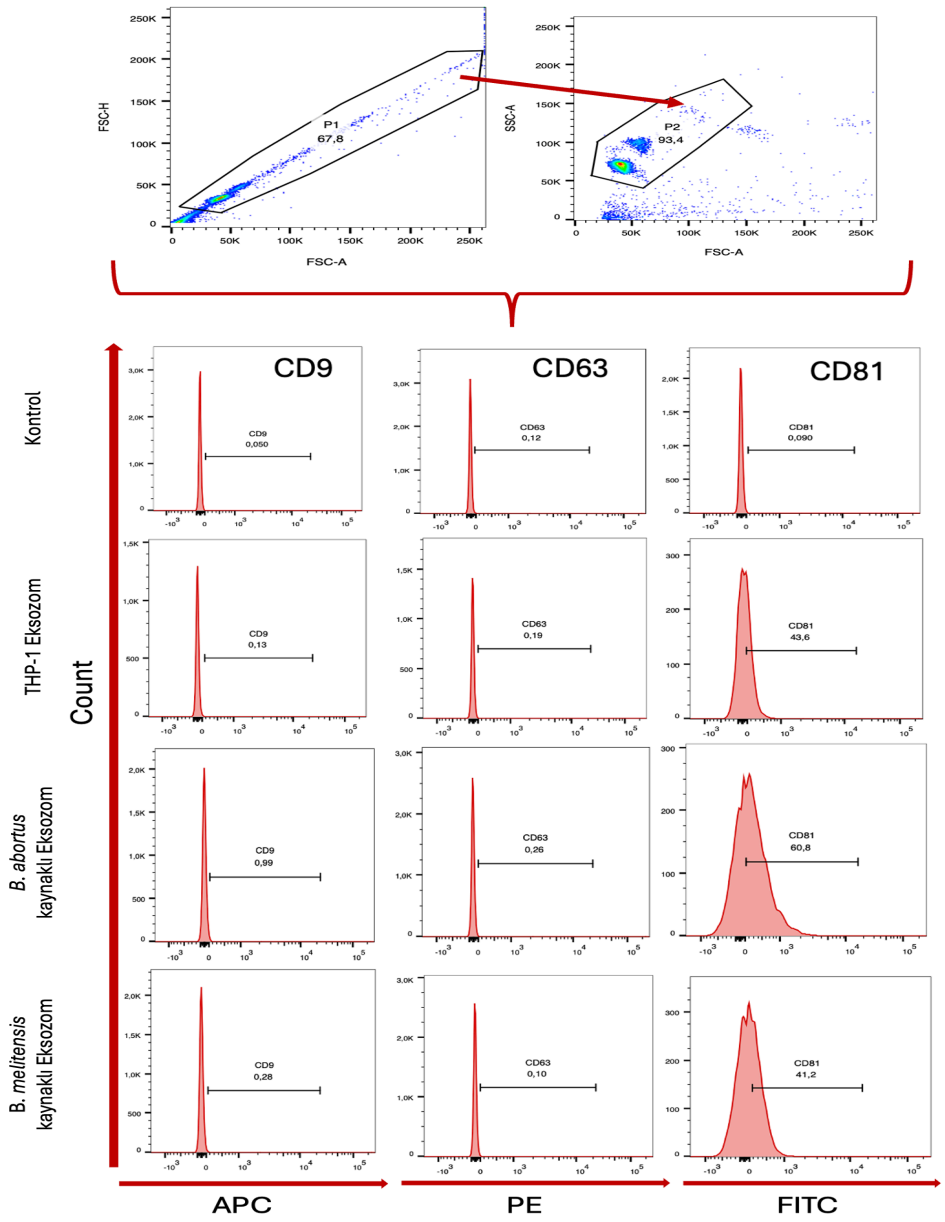
Tablo 5. İnaktif *Brucella* suşları ile muamele edilen THP-1 hücre hattından elde edilen eksozomların miktarları

	İnaktif *B. abortus* kaynaklı THP-1 eksozomu (500 uL)	İnaktif *B. melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomu (500 uL)	THP-1 eksozomu
Santrifüj sonrası eklenen total hacim	500 uL	500 uL	500 uL
ug/mL	1886,73	2022,75	2393,36
Total eksozom miktarı	943,36	1011,37	1196,68

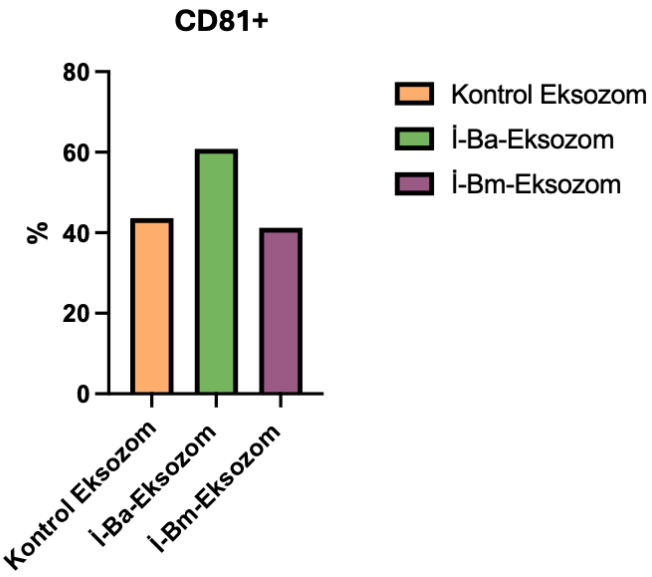
4.6. İnaktif *Brucella* Türleri ile Muamele Edilen THP-1 Kaynaklı Eksozomların Akan Hücre Ölçer Cihazı ile Tetraspaninlerinin Analizi

Karboksilateks boncuklarla bağlanan inaktif *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomları üzerinde akan hücre ölçer cihazında CD9, CD63 ve CD81 eksozom yüzey belirteçleri analiz edilmiştir. Analizler sonucunda Eksozomlar üzerinde CD81 yüzey belirteçlerinin varlığı gözlemlenmiştir. Sadece THP-1 eksozomu üzerinde CD81 seviyesinin %43,6 B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomlarında CD81 ifadesinin %41,2 düzeylerindeyken B.*abortus* kaynaklı eksozomlarda CD81 ifadesinin de %60,8

oranında çıktığı gözlemlenmiştir (Şekil 33 ve 34).



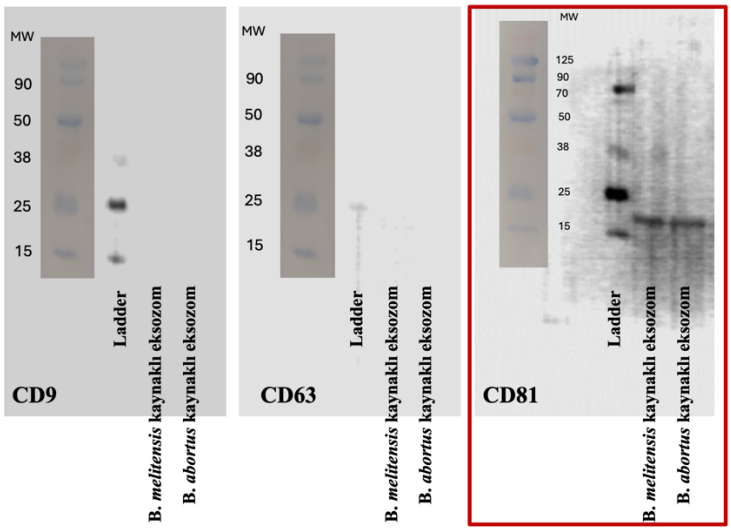
Şekil 33. Karboksilateks boncuklara bağlanan eksozomlar için akan hücre ölçer analizleri.



Şekil 34. Karboksilateks boncuklara bağlanan eksozomlar için akan hücre ölçer analizleri sonucunda CD81 yüzey belirteci ifadeleri (Kontrol eksozom: THP-1 kaynaklı eksozom, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomu ve İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomu).

4.7. İnaktif *Brucella* Türleri ile Muamele Edilen THP-1 Kaynaklı Eksozomların Western Blot Yöntemi ile Analiz Edilmesi

B. *melitensis* ve B. *abortus* kaynaklı THP-1 eksozomlarının western blot analizleri sonucunda eksozomlar üzerinde CD81 ifadesinin olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar akan hücre ölçer cihazı ile yapılan analizleri ile eş değer olarak bulunmuştur (Şekil 35).



Şekil 35. Eksozom karakterizasyonu için western blot yöntemi analiz görüntüsü.

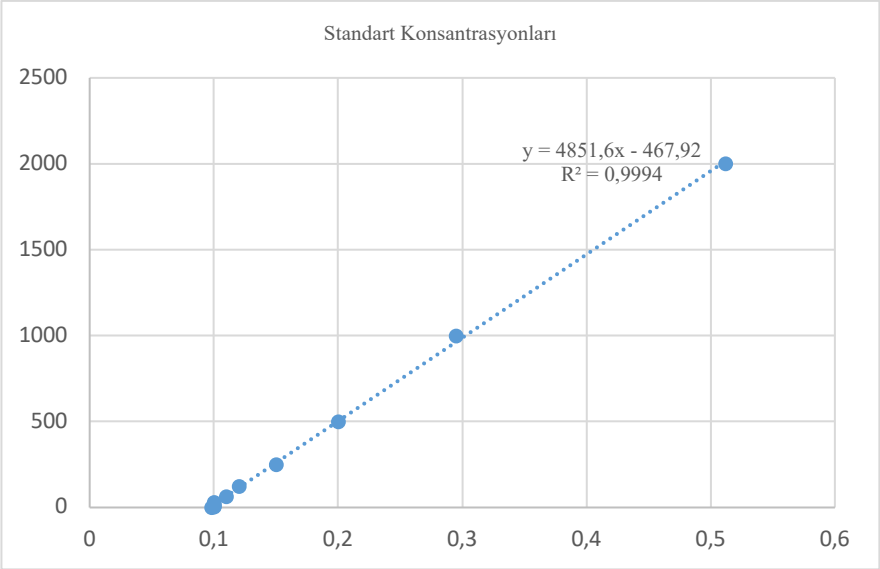
4.8. Canlı *Brucella* Türlerinden İzole Edilen Dış membran Veziküllerinin (OMV) Karakterizasyonu

4.8.1. Canlı *Brucella* suşlarından kit ile izole edilen dış membran veziküllerinin (OMV) Bikinkoninik Asit Tahlili (Bicinchoninic Acid Assay, BCA) yöntemi ile belirlenmesi

Canlı *Brucella* türleri üzerinden kit ile izolasyonu yapılan dış membran veziküllerinin (OMV) BCA kiti kullanılarak konsantrasyonları belirlenmiştir (Tablo 6). Konsantrasyon belirlendikten sonra ortaya çıkan standart değerler kullanılarak standart eğri grafiği oluşturulmuştur (Şekil 36).

Tablo 6. Dış membran veziküllerinin (OMV) BCA analizi için standart değerleri ve konsantrasyonları

Standart	Konsantrasyonları
0,512	2000
0,295	1000
0,2	500
0,15	250
0,12	125
0,11	62,5
0,1	31,25
0,1	15,62
0,1	7,81
0,1	3,905
0,098	1,9525



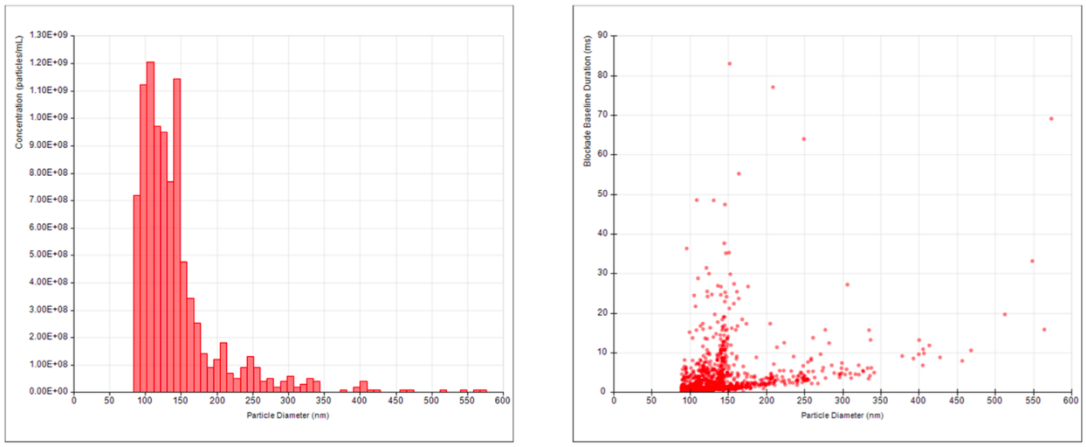
Şekil 36. Dış membran veziküllerinin (OMV) BCA analizi için standartlar kullanılarak hesaplanmış standart eğri.

Tablo 7. Canlı *Brucella* suşlarından kit ile izole edilen dış membran veziküllerinin (OMV) miktarları.

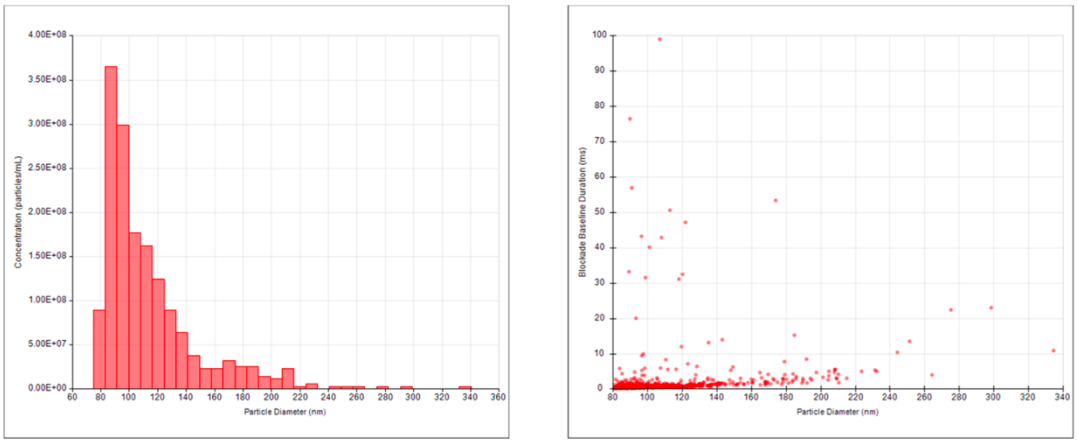
	Canlı *B. abortus* OMV (1,5 mL)	Canlı *B. melitensis* OMV (1,5 mL)	Canlı E. coli OMV (1,5 mL)
Santrifüj sonrası eklnen total hacim	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
ug/mL	500	437,5	278,3
Total eksozom miktarı	750	656,25	417,5

4.8.2. Dış membran veziküllerinin karakterizasyonu için TRPS analizleri

Dış membran veziküllerinin TRPS yöntemi ile yapılan partikül ölçüm sonuçlarında dış membran veziküllerinin ortalama partikül boyutları belirlenmiştir. Burada B. *abortus* bakterisinden izole edilen OMV'lerin 100-200 nm boyutlarında B. *melitensis* bakterisinden izole edilen OMV'lerin 80-160 nm boyutları arasında bulunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 37 ve 38).



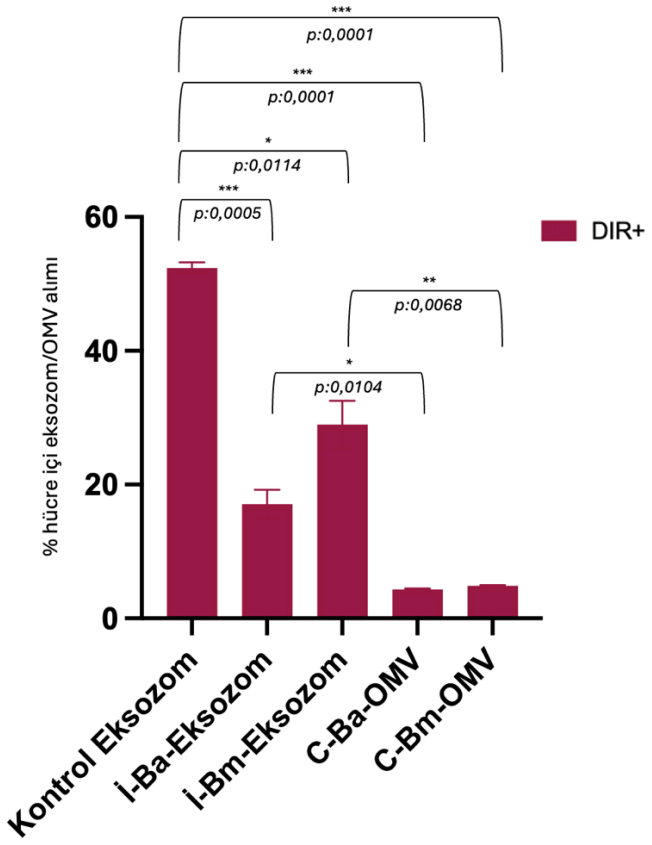
Şekil 37. B. *abortus* dış membran vezikülleri TRPS analizi ile partikül ölçüm sonuçları.



Şekil 38. B. *melitensis* dış membran vezikülleri TRPS analizi ile partikül ölçüm sonuçları.

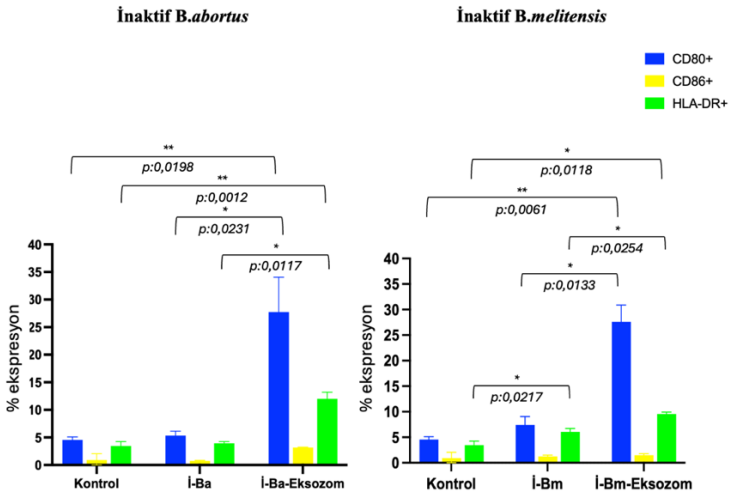
4.8.3 Dir boyası ile işaretlenmiş *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomlarının ve canlı *Brucella* kaynaklı OMV'lerin THP-1 hücre hattı ile kültüründen akan hücre ölçer analizleri

Eksozomların ve OMV'lerin takip edilebilmesi için Dir boyası işaretleme amacı ile kullanılmıştır. İşaretlenen eksozom ve OMV'ler THP-1 hücrelerine verilmiş ve Dir boyasının takibi akan hücre ölçer cihazı ile yapılarak yüzdesi belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda inaktif B.*melitensis* kaynaklı eksozomların hücre içi alımının diğer örneklere göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomlarının canlı *Brucella* kaynaklı OMV'lere oranla daha fazla hücre içine girdiği görülmüştür (Şekil 39).



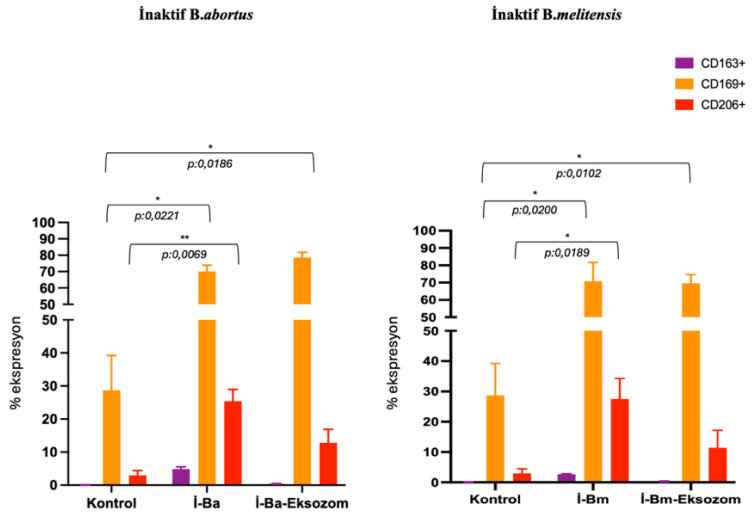
Şekil 39. THP-1 hücre hatlarının hücre içi eksozom ve OMV alımı (Kontrol eksozom: THP-1 kaynaklı eksozom, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomu, İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomu, C-Ba-OMV: Canlı B.*abortus* kaynaklı OMV ve C-Bm-OMV: Canlı B.*melitensis* kaynaklı OMV, $p<0,05$ *; $p<0,01$ **; $p<0,001$ ***).

İnaktif B.*melitensis* ve inaktif B.*abortus*'un ve inaktif *Brucella* türleri kaynaklı THP-1 eksozomlarının THP-1 hücre hattı ile kültüre edilmesinden sonra hücreler üzerinde CD80, CD86, HLA-DR, CD163, CD169 ve CD206 yüzey belirteçlerinin yüzde ekspresyonları akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda CD80 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin inaktif *Brucella* türlerinin kendisine oranla inaktif *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomlarının THP-1 hücreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 40).



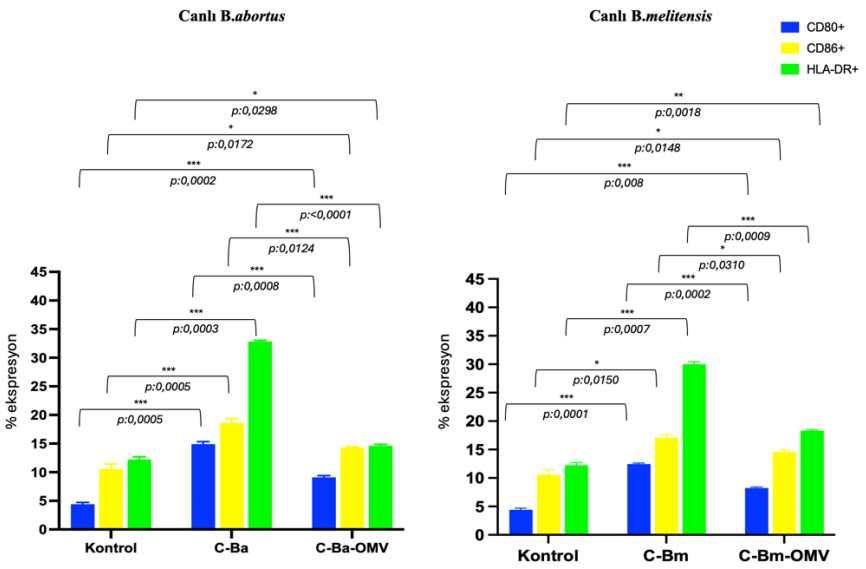
Şekil 40. İnaktif B.*abortus* ve B.*melitensis* ile muamele edilmiş hücre hatlarının CD80, CD86, HLA-DR yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, İ-Ba: İnaktif B.*abortus* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, İ-Bm: İnaktif B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, $p<0,05$ *; $p<0,01$ **).

Aynı zamanda THP-1 hücrelerinin CD169 yüzey belirteçleri incelendiğinde inaktif *Brucella* türleri ve inaktif *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomlarının aynı oranda artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir. Buna ek olarak CD206 yüzey belirteçlerinin inaktif *Brucella* türlerine maruz kalan THP-1 hücrelerinde inaktif *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomlarına maruz kalan THP-1 göre anlamlı bir artış gösterdiği görülmüştür (Şekil 41).

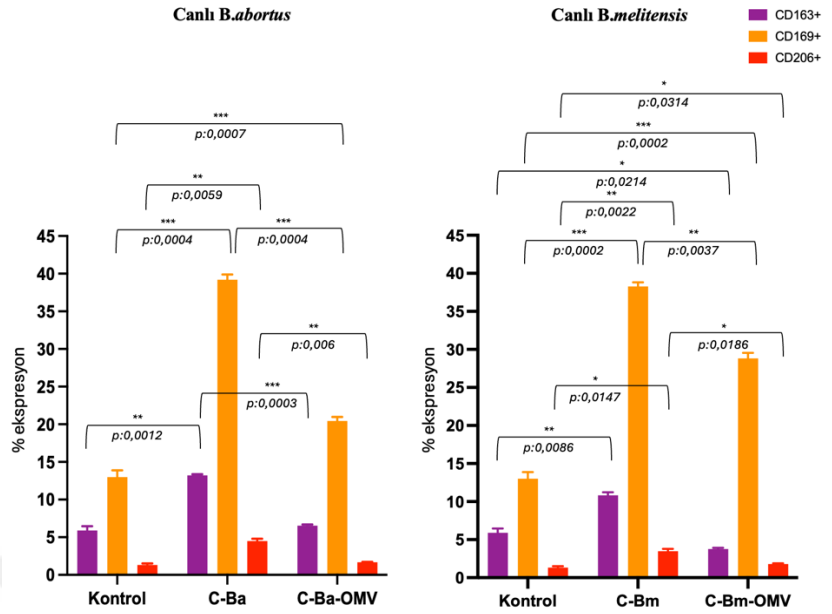


Şekil 41. İnaktif B.*abortus* ve B.*melitensis* ile muamele edilmiş hücre hatlarının CD163, CD169, CD206 yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, İ-Ba: İnaktif B.*abortus* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, İ-Bm: İnaktif B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, $p<0,05$ *; $p<0,01$ **).

Canlı *Brucella* çalışmalarına başlandığında THP-1 hücreleri canlı B.*abortus* ve B.*melitensis* ile enfekte edilmiştir. Ek olarak THP-1 hücreleri canlı B.*abortus* ve B.*melitensis* bakterilerinden izole edilen OMV'ler ile muamele edilmiştir. İnkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra THP-1 hücrelerinde CD80, CD86, HLA-DR, CD163, CD169 ve CD206 yüzey belirteçlerinin analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda CD80, CD86 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinde sadece THP-1 hücre hattı eklenen kültür kuyularına göre farklı *Brucella* koşullarına maruz bırakılan hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Aynı zamanda canlı *Brucella* ile enfekte edilmiş THP-1 hücrelerinde istatistiksel artış oranının OMV ile muamele edilen THP-1 hücrelerine oranla anlamlı olarak fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 42). Hücrelerin CD169 yüzey belirteçlerinin seviyeleri incelediğinde sadece THP-1 hücrelerine oranla diğer koşullarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Canlı *Brucella* türlerine maruz kalan hücrelerin OMV'lere maruz kalan hücrelere oranla CD169 yüzey belirteç seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuştur (Şekil 43).

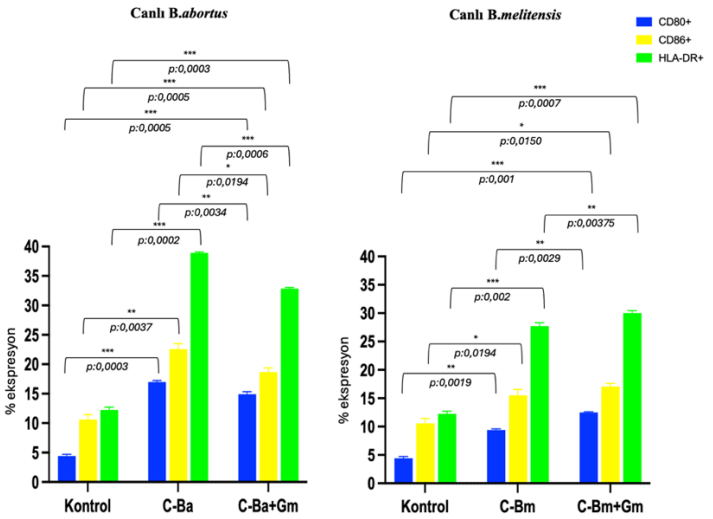


Şekil 42. Canlı B.*abortus* ve B.*melitensis* ile muamele edilmiş hücre hatlarının CD80, CD86, HLA-DR yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, C-Ba: Canlı B.*abortus* ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hattı, C-Ba-OMV: Canlı B.*abortus* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, C-Bm: Canlı B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve C-Bm-OMV: Canlı B.*melitensis* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, $p<0,05$ *; $p<0,01$ **; $p<0,001$ ***).



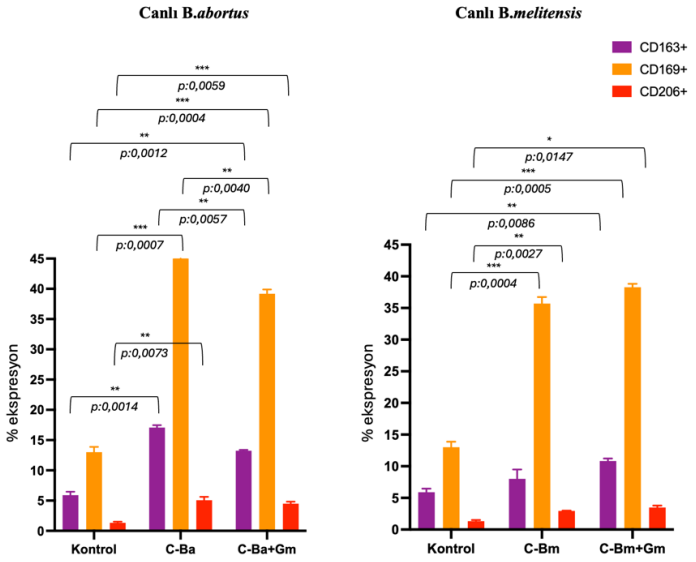
Şekil 43. Canlı B.*abortus* ve B.*melitensis* ile muamele edilmiş hücre hatlarının CD163, CD169, CD206 yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, C-Ba: Canlı B.*abortus* ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hattı, C-Ba-OMV: Canlı B.*abortus* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, C-Bm: Canlı B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve C-Bm-OMV: Canlı B.*melitensis* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, $p<0,05$ *; $p<0,01$ **; $p<0,001$ ***).

THP-1 hücreleri canlı *Brucella* ile enfekte edildikten sonra kültür ortamında THP-1 hücrelerine giremeyen bakterilerin ortamdan elimine edilmesin için gentamisin kullanılmıştır. Burada gentamisinin varlığının ve yokluğunun karşılaştırılması adına THP-1 hücrelerinin canlı *Brucella* türleri ile enfekte edilmesi kültür koşulu gentamisin içermeyen kültür ortamı olarak da hazırlanarak karşılaştırma yapılmıştır. Canlı *Brucella* türleri ile enfekte edilen THP-1 hücre kültürü koşullarınının gentamisin ile muamele edilmesi sonucunda hücreler üzerinde CD80, CD86, HLA-DR, CD163, CD169 ve CD206 yüzey belirteçleri akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir. Analizler sonucunda hücreler üzerinde sadece THP-1 hücrelerine göre *Brucella* türleri ile enfekte olan THP-1 hücrelerinde istatistiksel olarak artış gözlemlenmiştir. Buna ek olarak hücreler gentamisin varlığında analiz edildiğinde B.*abortus* bakterisinin hücreler üzerinde CD80, CD86 ve HLA-DR ifadelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (Şekil 44).



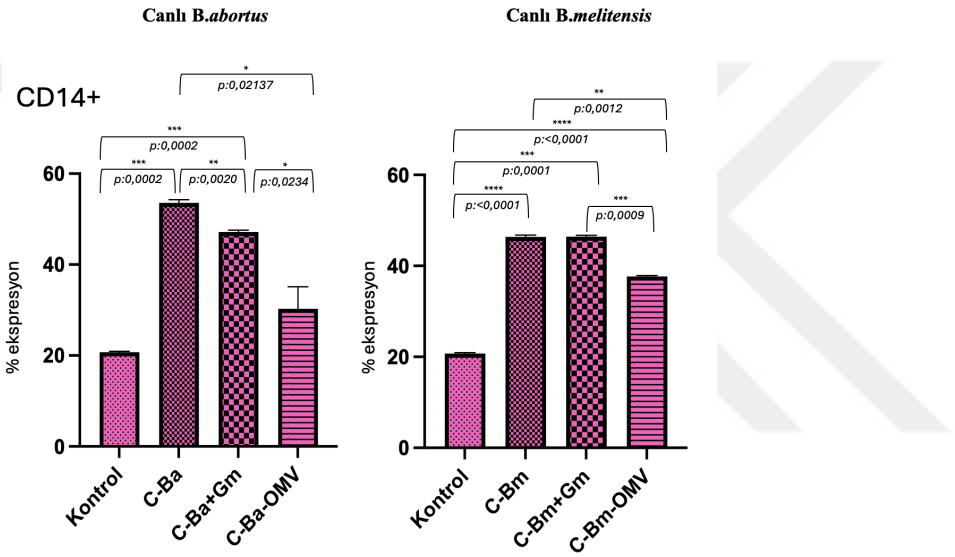
Şekil 44. Canlı B.*abortus* ve B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattının gentamisin ile muamele edilmesi sonucunda CD80, CD86, HLA-DR yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, C-Ba: Canlı B.*abortus* ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hattı, C-Ba-OMV: Canlı B.*abortus* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, C-Bm: Canlı B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve C-Bm-OMV: Canlı B.*melitensis* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, Gm: gentamisin; p<0,05 *; p<0,01 **; p<0,001 ***).

Brucella ile karşılaşan hücrelerin gentamisin varlığında CD163, CD169 ve CD206 yüzey belirteçlerinin ifadelerine bakıldığında CD163 ve CD169 ekspresyonlarında sadece THP-1 hücre hatlarına göre istatistiksel olarak artış gözlemlenmektedir (Şekil 45).



Şekil 45. Canlı B.*abortus* ve B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattının gentamisin ile muamele edilmesi sonucunda CD163, CD169, CD206 yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, C-Ba: Canlı B.*abortus* ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hattı, C-Ba-OMV: Canlı B.*abortus* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, C-Bm: Canlı B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve C-Bm-OMV: Canlı B.*melitensis* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, Gm: gentamisin; p<0,05 *; p<0,01 **; p<0,001 ***).

Canlı *Brucella* türleri ile enfekte olan THP-1 hücrelerinin CD14 yüzey belirteçleri akan hücre ölçer cihazı sonuçlarına göre analiz edildiğinde hücrelerin CD14 seviyelerinde anlamlı bir istatistiksel artış gerçekleşmiştir. B.*abortus* ile enfekte edilmiş THP-1 hücrelerinde gentamisin varlığında hücrelerin CD14 seviyelerinin gentamisin yokluğuna oranla istatistiksel olarak azaldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda *Brucella* türlerinin OMV'lerine maruz bırakılmış hücrelerin canlı *Brucella* ile karşılaşan hücrelere oranla CD14 seviyelerinin istatistiksel anlamda azaldığı bulunmuştur (Şekil 46).



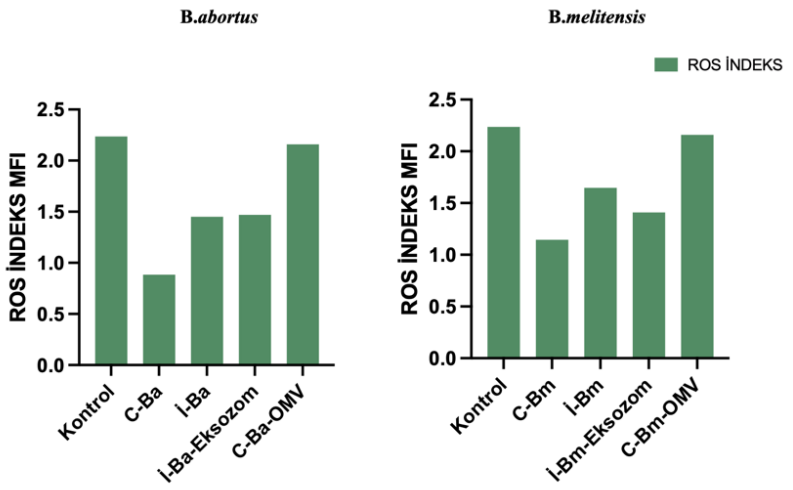
Şekil 46. Canlı B.*abortus* ve B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattının gentamisin ile muamele edilmesi sonucunda CD14 yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, C-Ba: Canlı B.*abortus* ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hattı, C-Ba-OMV: Canlı B.*abortus* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, C-Bm: Canlı B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve C-Bm-OMV: Canlı B.*melitensis* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, Gm: gentamisin; $p<0,05$ *; $p<0,01$ **; $p<0,001$ ***).

4.8.4 Hücre içi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) ve Nitrik Oksit'in (NO) akan hücre ölçer cihazında analiz edilmesi

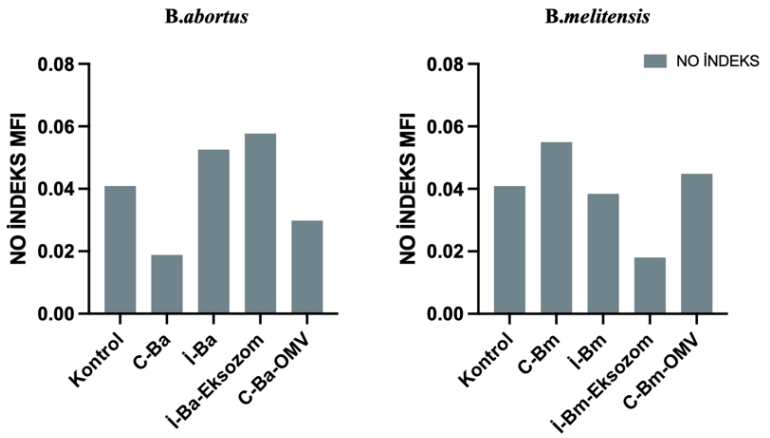
THP-1 hücrelerinin farklı *Brucella* koşullarında salgıladıkları ROS seviyeleri analiz edildiğinde sadece THP-1 hücrelerine oranla canlı B.*abortus* ile karşılaşan hücrelerde %60, inaktif B.*abortus* ile karşılaşan hücrelerde %34,09, inaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomlarına maruz bırakılmış hücrelerde %33,18, canlı B.*abortus* OMV'leri ile karşılaşan hücrelerde %4,55, canlı B.*melitensis* ile karşılaşan hücrelerde %48, inaktif B.*melitensis* ile karşılaşan hücrelerde %25,23, inaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomlarına maruz bırakılmış hücrelerde %36,36 ve canlı

B.*melitensis* OMV'leri ile karşılaşan hücrelerde %4,55'lik bir azalma gözlemlenmektedir (Şekil 47).

Hücrelerin NO üretim kapasitelerine bakıldığında ise farklı *Brucella* koşulları akan hücre ölçer cihazında analiz edildiğinde THP-1 hücrelerine oranla inaktif B.*abortus* ile karşılaşan hücrelerde %30, inaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomlarına maruz bırakılmış hücrelerde %42,5 ve canlı B.*melitensis* ile karşılaşan hücrelerde %25 oranında artış göstermektedir. Bunlara ek olarak NO hücre üretim kapasiteleri açısından THP-1 hücrelerine oranla canlı B.*abortus* ile karşılaşan hücrelerde %75, canlı B.*abortus* OMV'leri ile karşılaşan hücrelerde %27,5, inaktif B.*melitensis* ile karşılaşan hücrelerde %25, inaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomlarına maruz bırakılmış hücrelerde %25 azalma bulunmuştur (Şekil 48).



Şekil 47. Hücrelerin farklı *Brucella* kaynakları ile muamele edilmesi ile oluşan ROS üretim kapasiteleri (MFI: ortlama floresan yoğunluğu)(Kontrol: THP-1 hücre hattı, C-Ba: Canlı B.*abortus* ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba: İnaktif B.*abortus* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, C-Ba-OMV: Canlı B.*abortus* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, C-Bm: Canlı B.melitensis ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Bm: İnaktif B.melitensis ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı ve C-Bm-OMV: Canlı B.*melitensis* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı)**.**



Şekil 48. Hücrelerin farklı *Brucella* kaynakları ile muamele edilmesi ile oluşan NO üretim kapasiteleri (MFI: ortlama floresan yoğunluğu)(Kontrol: THP-1 hücre hattı, C-Ba: Canlı B.*abortus* ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba: İnaktif B.*abortus* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, C-Ba-OMV: Canlı B.*abortus* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, C-Bm: Canlı B.*melitensis* ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Bm: İnaktif B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı ve C-Bm-OMV: Canlı B.*melitensis* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı)**.**

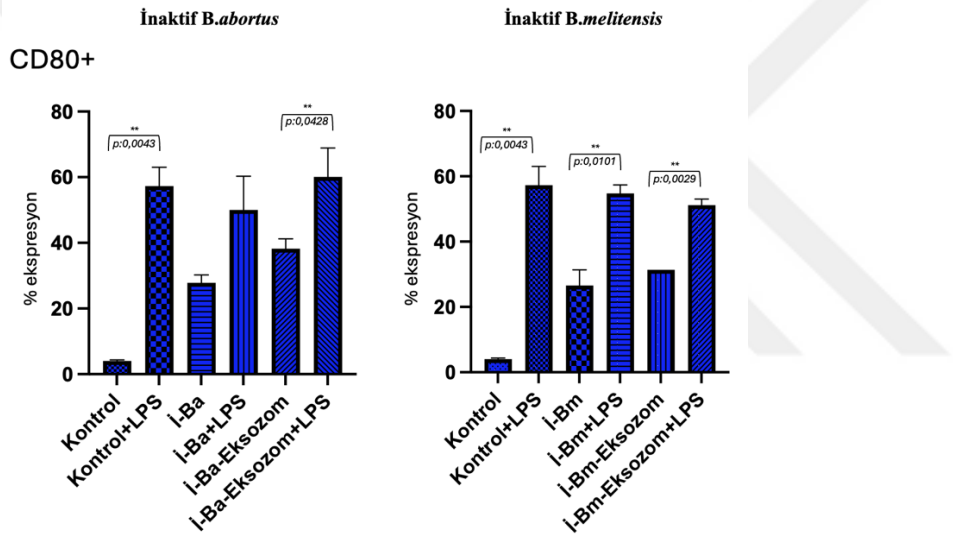
Çalışmamızın bu aşamasına kadar elde ettiğimiz veriler Tablo 8'de özetlenmektedir.

Tablo 8. Kontrol grubu THP-1 hücre hattı ile çalışmada kullanılan diğer kültür koşullarının karşılaştırılması (C-Ba: Canlı B.*abortus* ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hattı, C-Bm: Canlı B.*melitensis* ile enfekte edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba: İnaktif B.*abortus* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Bm: İnaktif B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, C-Ba-OMV: Canlı B.*abortus* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, C-Bm-OMV: Canlı B.*melitensis* kaynaklı OMV'lere maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı; istatistiksel olarak yukarı oklar anlamlı bir artışı, aşağı oklar anlamlı bir azalışı ve çizgiler anlamlılık olmadığını göstermektedir).

	CD14	CD80	CD86	HLA-DR	CD163	CD169	CD206	ROS	NO
C-Ba	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑	↓	↓
C-Bm	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑	↑↑	↑↑↑	↑	↓	↑
İ-Ba	↑↑	-	-	-	-	↑↑	↑↑	↓	↑
İ-Bm	↑↑	-	-	↑	-	↑	↑	↓	↑
C-Ba-OMV	↑	↑↑↑	↑	↑	-	↑↑↑	-	-	↓
C-Bm-OMV	↑↑↑	↑	↑	↑↑	↑	↑↑↑	↑	-	-
İ-Ba-Eksozom	↑↑	↑↑	-	↑↑	-	↑	-	↓	↑
İ-Bm-Eksozom	↑↑	↑↑	-	↑	-	↑	-	↓	↓

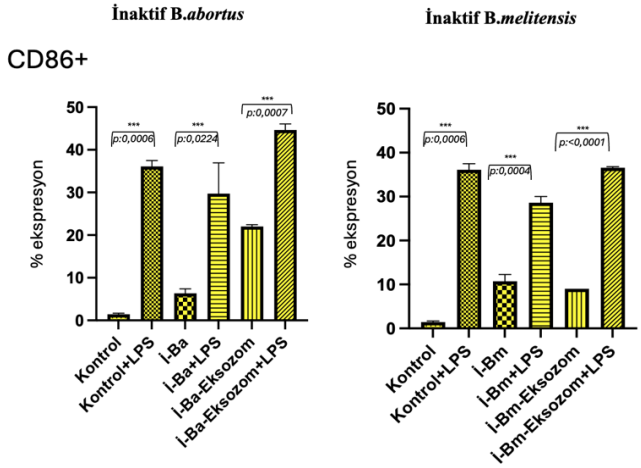
4.8.5 THP-1 hücre hatlarında inaktif *Brucella* türleri ve inaktif *Brucella* türleri kaynaklı eksozomların LPS varlığında akan hücre ölçer analizleri

İnaktif *Brucella* türleri ile karşılaşan THP-1 hücrelerinde CD80, CD86, HLA-DR, CD163, CD169 ve CD206 yüzey belirteçlerinin ifadelerini daha iyi karşılaştırabilmek adına LPS varlığında hücreler akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre inaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomlarının LPS varlığında hücreler üzerinde CD80 yüzey belirteci seviyelerinde istatistiksel olarak artış görülmüştür. Buna ek olarak inaktif B.*melitensis* ve inaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomları ile LPS varlığında karşılan hücrelerde anlamlı bir artış meydana gelmiştir (Şekil 49).



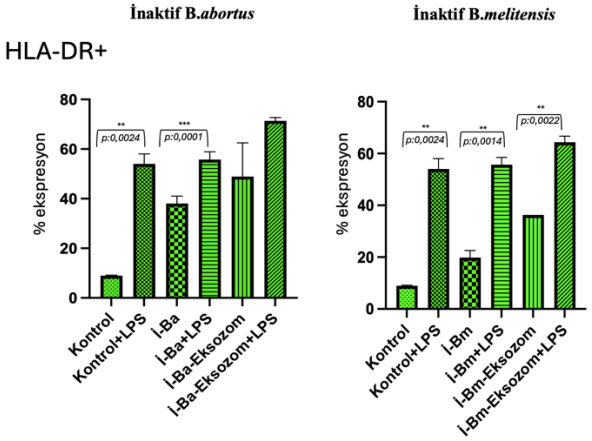
Şekil 49. İnaktif B.*abortus* ve B.*melitensis* ve *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomları ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattının LPS ile uyarılması sonucunda CD80 yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, İ-Ba: İnaktif B.*abortus* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, İ-Bm: İnaktif B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, $p<0,01$ **).

Hücrelerin CD86 seviyelerinde bakıldığında LPS varlığında gerçekleştirilen hücre kültürü koşullarının hem inaktif *Brucella* türleri ile hem de inaktif *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomları ile karşılaştıklarında ekspresyonlarını arttırdıkları istatistiksel olarak analiz edilmiştir (Şekil 50).



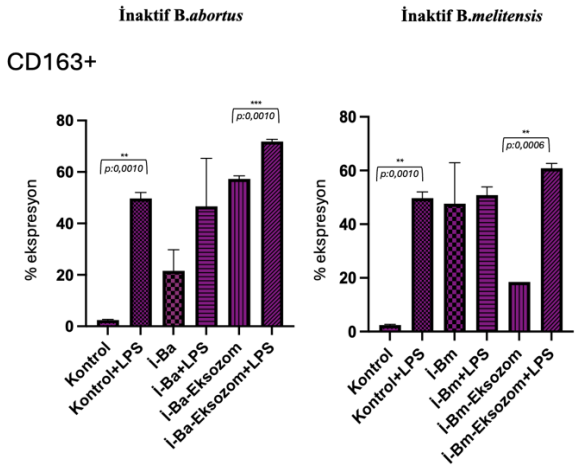
Şekil 50. İnaktif B.*abortus* ve B.*melitensis* ve *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomları ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattının LPS ile uyarılması sonucunda CD86 yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, İ-Ba: İnaktif B.*abortus* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, İ-Bm: İnaktif B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, p<0,001 ***).

LPS varlığında hücrelerde HLA-DR seviyeleri analiz edildiğinde inaktif B.*abortus* bakterisine maruziyetin istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda inaktif B.*melitensis* ve inaktif B.*melitensis* bakterilerine maruz bırakılmış THP-1 kaynaklı eksozomlar ile karşılaşan hücrelerde istatistiksel açıdan anlamlılık görülmüştür (Şekil 51).

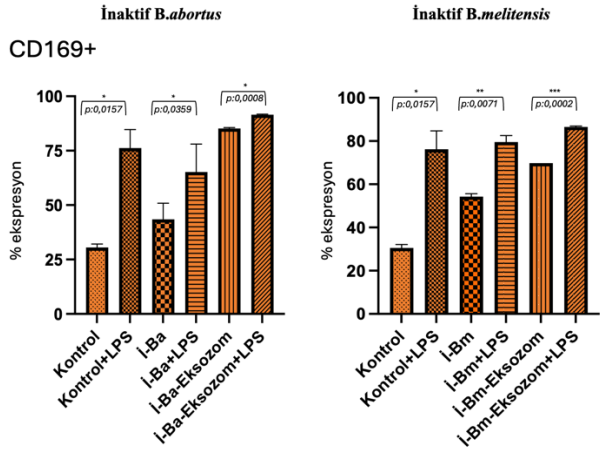


Şekil 51. İnaktif B.*abortus* ve B.*melitensis* ve *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomları ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattının LPS ile uyarılması sonucunda HLA-DR yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, İ-Ba: İnaktif B.*abortus* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, İ-Bm: İnaktif B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, p<0,01 **; p<0,001 ***).

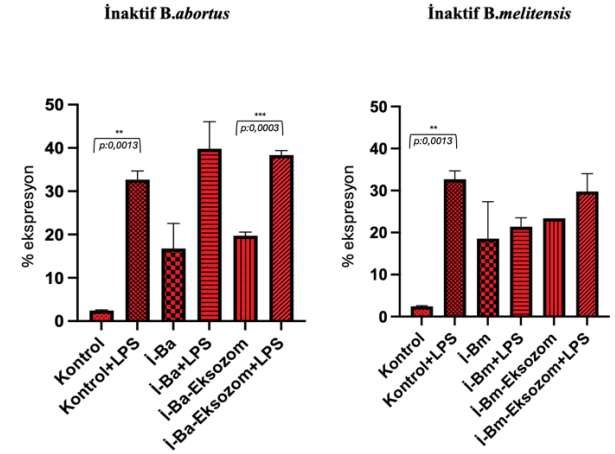
İnaktif *Brucella* türleri kaynaklı THP-1 eksozomları ile LPS varlığında muamele edilen THP-1 hücre hatlarında istatistiksel açıdan LPS yokluğuna göre bir artış gözlemlenmiştir. THP-1 hücrelerinde CD206 yüzey belirteçleri analiz edildiğinde İnaktif *Brucella* türleri kaynaklı THP-1 eksozomlarının hücrelerle karşılaştıkları koşullarda LPS varlığında istatistiksel açıdan bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 52). Hücrelerin CD169 seviyeleri analiz edildiğinde her iki bakteri ve eksozom türü içinde LPS varlığında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 53). Aynı zamanda inaktif B. *abortus* kaynaklı THP-1 eksozomu ile karşılaşan hücrelerin LPS ile uyarılması durumunda CD206 yüzey belirteç ekspresyonunda istatistiksel bir artış bulunmuştur (Şekil 54).



Şekil 52. İnaktif B.*abortus* ve B.*melitensis* ve *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomları ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattının LPS ile uyarılması sonucunda CD163 yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, İ-Ba: İnaktif B.*abortus* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, İ-Bm: İnaktif B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, $p<0,01$ **; $p<0,001$ ***).

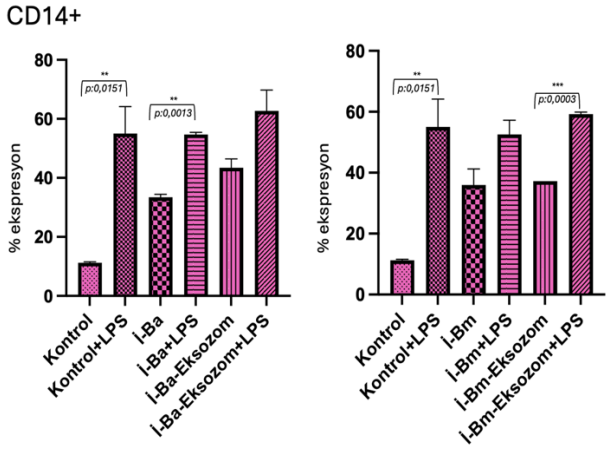


Şekil 53. İnaktif B.*abortus* ve B.*melitensis* ve *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomları ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattının LPS ile uyarılması sonucunda CD169 yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, İ-Ba: İnaktif B.*abortus* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, İ-Bm: İnaktif B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, p<0,05 *; p<0,01 **; p<0,001 ***).



Şekil 54. İnaktif B.*abortus* ve B.*melitensis* ve *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomları ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattının LPS ile uyarılması sonucunda CD206 yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, İ-Ba: İnaktif B.*abortus* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, İ-Bm: İnaktif B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, p<0,01 **; p<0,001 ***).

İnaktif *Brucella* kaynaklı THP-1 hücre kültürü çalışmalarında LPS varlığında hücrelerin CD14 yüzey belirteçlerine bakıldığında inaktif B.*abortus* bakterisi ile muamele edilmiş THP-1 hücrelerinde istatistiksel bir artış gözlemlenmiştir. Buna ek olarak inaktif melitensis kaynaklı THP-1 eksozomları ile muamele edilen THP-1 hücre hattında LPS ile uyarım gerçekleştirildiğinde anlamlı bir artış meydana gelmektedir (Şekil 55).



Şekil 55. İnaktif B.*abortus* ve B.*melitensis* ve *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomları ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattının LPS ile uyarılması sonucunda CD14 yüzde ekspresyonu (Kontrol: THP-1 hücre hattı, İ-Ba: İnaktif B.*abortus* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı, İ-Ba-Eksozom: İnaktif B.*abortus* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, İ-Bm: İnaktif B.*melitensis* ile muamele edilmiş THP-1 hücre hattı ve İ-Bm-Eksozom: İnaktif B.*melitensis* kaynaklı THP-1 eksozomuna maruz bırakılmış THP-1 hücre hattı, $p<0,01$ **; $p<0,001$ ***).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bruselloz, dünya çapında yaygın bir zoonotik hastalık türüdür. Hastalığın gelişmesine *Brucella* organizmaları sebep olmaktadır. *Brucella* gram negatif fakültatif bir bakteri çeşididir. Bu tür patojenler konağın bağışıklık sistemini modüle ederek öncelikle doğal bağışıklık sisteminden daha sonra da edinsel/adaptif bağışıklık sisteminden kaçma konusunda başarılıdırlar. *Brucella* bakterilerinin kronik enfeksiyon oluşturma yetenekleri bulunmaktadır. Farklı virülans faktörlerini ifade ederek konağın immün sisteminden çeşitli stratejiler doğrultusunda kaçarak bulundukları yerde hayatta kalıp çoğalmayı başarmaktadırlar.

Dış membran vezikülleri (OMV'ler) gram negatif bakteriler tarafından çift katmanlı lipid zar yapısından tomurcuklanarak meydana gelen yapılardır. Yapılarında DNA, peptidoglikan, toksinler, enzimler, proteinler, LPS ve dış membran proteinleri bulundurmaktadırlar. Hücre içi ve hücre dışı iletişimde bir dizi fizyolojik süreçte görev almaktadırlar.

Eksozomlar ortalama ~100 nm çapındaki tüm hücreler tarafından üretilen hücre dışı veziküllerdir (EV). RNA, DNA, protein ve lipit yapılarını taşıyarak hücreler arası otokrik ve parakrin iletişimlerin gerçekleşmesini sağlamaktadırlar.

THP-1 hücre hattı insan monositik hücre hattıdır. Genel olarak insan makrofajına alternatif olarak kullanılmaktadırlar. THP-1 monositik hücreleri farklılaşabilecekleri spesifik uyarıcılara maruz kaldıkları zaman M1 ve M2 dahil makrofaj gruplarına ve çeşitli fonksiyonel makrofaj alt tiplerine polarize olabilecek bir sistem görevi görmektedir.

Antijen sunan hücreler, T hücrelerini aktifleştirebilmek için antijenlerin sunumun yanı sıra eş uyaran sinyallerine ihtiyaç duymaktadırlar. CD80 ve CD86 yüzey belirteçleri antijen sunan hücrelerde ifade edilmektedirler. Aynı zamanda HLA-DR yüzey belirteçleri de antijen sunumunda ve bununla beraber adaptif bağışıklık yanıtının düzenlenmesi için önemlidir. HLA-DR Majör Histokompatibilite Kompleksi Sınıf II (MHC Sınıf II) moleküllerinden biridir ve CD4+ T hücre gruplarına antijen sunumunda görev almaktadırlar.

Çalışmamız sonucunda elde edilen verilere göre THP-1 hücrelerinin inaktif *Brucella* türleri, canlı *Brucella* türleri, inaktif *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomları

ve canlı *Brucella* OMV'leri muamele edilmesi sonucunda CD80, CD86 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin ifadelerine bakılmıştır.

Doğal bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan monositler/makrofajlar patojenlere karşı öncelikli savunma mekanizmasında rol oynamaktadırlar. Antijen sunumu yaparak ve aynı zamanda fagositoz mekanizmasını kullanarak bağışıklığın korunmasını ve düzenlenmesini sağlamakta görev alırlar (Weiss & Schaible, 2015). Monosit hücre grubunun doku mikroçevresine bağlı olarak polarizasyon yetenekleri değişmektedir. M1 makrofajlar, pro-inflamatuar sitokinler üreten klasik makrofajlardır. Görevleri patojenleri ortamdan elimine etmektir. Bununla birlikte doku hasarına da neden olabilmektedirler. IL-12, TNF-α, CCL15, IL-1β, CXCL13, IL-18, CCL20, ve CXCL8-11 gibi kemokinlerin ve sitokinlerin üretilmesi sayesinden tip 1 bağışıklık yanıtını aktive edebilmektedirler. M2 makrofajlar anti-inflamatuar sitokinler üretmektedirler ve ana görevleri inflamasyonu baskılamaktır. Buna ek olarak doku onarımı ve yara iyileşmesinde rol oynamaktadırlar (Martinez, Helming & Gordon, 2009). M2 makrofajları ise tip 2 bağışıklık yanıtlarını aktive ederler (Han ve ark., 2013).

Literatüre bakıldığında birçok hastalık için M1/M2 polarizasyonu tanımlanmıştır. Buna rağmen *Brucella* enfeksiyonu için net bir tanımlama bulunmamaktadır (Dey, Allen, & Hankey-Giblin, 2015). Yapılan bir çalışma üzerinde *Brucella* enfeksiyonu nedeniyle bruselloz geçiren hastalar üzerinde monositler M1 ya da M2 makrofajlarına polarize olma potansiyellerinin bozulduğu gösterilmektedir (Wang ve ark., 2017). Ancak bruselloz hastalarında *Brucella* bakterisinin makrofaj polarizasyonuna etkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Araştırmamız kapsamında THP-1 monositik hücrelerine inaktif *Brucella* türleri, canlı *Brucella* türleri, inaktif *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomları ve canlı *Brucella* OMV'leri muamele edilmesi sonucunda CD80, CD86 ve HLA-DR ekspresyonlarında artış gözlemlenmiştir. İnaktif *Brucella* türleri ve inaktif *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomlarının THP-1 hücrelerine olan etkisi karşılaştırdığında eksozom eklenen koşulların CD80 ekspresyonunda daha yüksek bir artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir. Bu da inaktif *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomlarının THP-1 monositik hücrelerini antijen sunumuna daha hızlı yönlendirebileceğini düşündürmektedir. Buna benzer olarak HLA-DR seviyesinde de eksozomla karşılaşan hücre grubunda ekpresyonun

daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Burada görülen durumda HLA-DR seviyesinin eksozom eklenen koşullarda artış göstermesi negatif bir sonuç olarak görülebilir. Bunun sebebi Brucella enfeksiyonun HLA-DR seviyesinin artması immün sistemin CD4 T hücreleri aracılığı ile enfeksiyona yardım etmesinden kaynaklıdır. Bu sebeple eksozomların HLA-DR seviyesindeki artışı negatif bir sonuç olarak yorumlanabilir. Bunun yanı sıra çalışmamızda canlı *Brucella* türleri ile karşılaşan hücreler ve canlı *Brucella* OMV'leri ile karşılaşan hücrelere bakıldığında durum farklı yönde seyretmektedir.

Canlı *Brucella* türleri ile enfekte edilen ve OMV'lere maruz kalan THP-1 hücrelerine bakıldığında Canlı *Brucella* ile karşılaşan hücrelerde CD80, CD86 ve HLA-DR seviyelerindeki artışın daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin *Brucella* bakterilerinin LPS'inin klasik gram negatif bakteri türlerinden farklı olarak etki göstermesinden ve zayıf TLR4 aktivasyonu sağlamasının sonucu olduğu düşünülebilir. Burada CD80 ve CD86 seviyesinin antijen sunumu için artış göstermesi immün sistemin doğal olarak gerçekleştireceği bir durum olarak kabul edilebilir. Buna ek olarak OMV eklenen koşullarda HLA-DR seviyesinin canlı *Brucella* ile enfekte olan THP-1 hücrelerine göre anlamlı bir düşüş göstermesi, immün sisteme *Brucella* bakterilerinin tanıtılabilmesi açısından aşıya yönelik kullanılabilecek OMV'lerin üretilebilmesi açısından anlamlı bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır.

M2 makrofaj grubunun belirteci olarak CD163 ve CD206 bir transmembran reseptörüdür. Patojenlerin tanınması, fagosite edilmesi ve eliminasyonunda rol oynamaktadırlar. CD169 yüzey belirteci bir diğer adı ile Siglec-1 olarak da isimlendirilmektedir. İmmün hücreler arası etkileşimlerde önemli rol oynamaktadırlar.

Yapılan bir çalışmada *Brucella* enfeksiyonu olan hastalarda bulunan M2 tip makrofajlarda CD163 ekspresyonun, kontrol sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu, aynı zamanda M2 makrofajlardaki CD206 yüzey belirteçlerinin ifadesinde herhangi bir anlamlılık bulunmadığı gösterilmiştir (Wang ve ark., 2017).

Literatürde bulunan bir diğer çalışmada *Brucella* enfeksiyonu sonucunda bazı makrofaj popülasyonlarındaki değişimler analiz edilmiş ve bulgularında CD169 hücre yüzey belirteçlerinin ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Yine aynı ekibin yaptığı bir çalışma üzerinde B. *abortus* ve B.*suis* ile enfekte edilmiş olan C57BL/6 farelerindeki

marjinal zon makrofajları (dalakta marjinal zon denilen bölgede bulunurlar) üzerinde CD169 ekspresyonları analiz edilmiş (Machelart ve ark., 2017).

Çalışmamız kapsamındaki bulgulara bakıldığında CD163 ve CD206 seviyelerinin belirli bir oranda sadece THP-1 hücresine göre canlı *Brucella* türleri ile muamele eden koşullarda inaktif *Brucella* eklenen koşullara göre arttığı gözlemlenmiştir. Buna ek olarak eksozom ve OMV eklenen koşullarda daha sınırlı bir artış gözlemlenmiştir. Hücrelerin CD169 seviyeleri incelediğinde inaktif *Brucella* ile muamele edilen hücre gruplarında canlı *Brucella* ile enfekte edilen hücrelere göre artış daha fazla görülmüştür. Bu *Brucella* bakterilerinin canlı olan hücre kültürü koşulu için bakterilerin immün sistemden kaçış stratejisi ile uyumludur. LPS ile uyarılan hücrelerde ise CD163, CD169 ve CD206 seviyelerindeki artışın beklenildiği gibi arttığı görülmüştür.

Canlı *Brucella* türleri ve inaktif *Brucella* türlerinin CD169 seviyelerindeki bu değişimin sebebinin inaktif *Brucella* kaynaklı koşullarda, CD169 seviyelerini canlı *Brucella*'ya oranla anlamlı olarak artış görülmesinde THP-1 hücrelerinin inaktif bakteri üzerindeki LPS'leri kolayca tanıması sonucu olduğu düşünülebilir. Buna ek olarak canlı *Brucella* bakterileri kaçış stratejilerini gerçekleştirdiğinden hücrelerin CD169 ifadeleri üzerinde etki göstererek daha az miktarda artış gerçekleştirdikleri görülmüştür.

Çalışmamız kapsamında aynı zamanda OMV ile muamele edilen THP-1 hücrelerinde inaktif *Brucella* türleri ve canlı *Brucella* türlerine göre artışın daha az olduğu ve bunun da CD80 ve CD86 seviyesinin de diğer gruplara göre OMV ile muamele edilen koşullarda daha az olması ile birleştirilmesi ile THP-1 hücreleri üzerinde OMV etkisinin hücreleri uyaracak kadar etkili olduğu ve buna ek olarak diğer gruplar kadar hücreleri aktive etmediği gösterilmiştir.

İmmün sistemin patojenler tarafından uyarılması sonucu olarak CD14 ekspresyonu enfeksiyon başlangıcından itibaren hızla artmaktadır. Literatüre bakıldığında bir çalışmada bruselloz hastaları üzerinde CD14 seviyelerinin sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı oranda arttığı gösterilmiştir (Yanık, 2024). Bu sonuç çalışmamızdaki CD14 ifadelerindeki artış ile uyumludur. Koşullar arasındaki farklara bakıldığında CD14 ekspresyon seviyelerinin canlı *Brucella* ile karşılaşan hücrelerde en çok artışı gösterdiği bunu takiben inaktif *Brucella* kaynaklı THP-1 eksozomlarının

hücreler üzerindeki CD14 seviyelerindeki artışın inaktif *Brucella* türlerine göre fazla olduğu gözlemlenmiştir. Burada yine OMV'ler ile karşılaşan THP-1 hücrelerindeki artışın diğer gruplara göre az fakat sadece THP-1 hücrelerine göre fazla olması OMV'lerin hücrelerin uyarılması adına yeterli olabileceğini göstermektedir.

Normal koşullarda monosit ve makrofaj hücre grupları bakteriyel bir enfeksiyona maruz kaldıklarında NO ve ROS üreterek bakterilerin ortamdan elimine edilmesini sağlamaktadırlar. Ancak *Brucella* kaynaklı enfeksiyonlarında *Brucella* bakterileri hücre içi patojen olarak bu savunma hattından kaçabilmek üzere evrimleşmişlerdir. Literatürdeki bulgular *Brucella* enfeksiyonun THP-1 hücreleri üzerindeki ROS ve NO seviyelerini düşürdüğüne dair kanıtlar sunmaktadır (Cong ve ark., 2020; Shengnan, Yajun, Jiang, Meihua, & Yuanzhi, 2021). Çalışmamızda THP-1 hücrelerindeki ROS seviyelerinin *Brucella* türleri ile karşılaştıklarında literatür ile uyumlu olarak azaldığını göstermektedir. Bunun bakteri için iyi olsa da immün sistem için kötü olduğu bilinmektedir. Buna ek olarak canlı *Brucella* kaynaklı OMV koşullarında hücrelerin ROS seviyelerinde THP-1 hücrelerine göre bir azalma göstermediği görülmüştür. Bu sonuç OMV koşullarının makrofajların aktifleşebilmesi için bir ortam hazırladığı anlamına gelmektedir. Buna ek olarak canlı B.*abortus* bakterisinin hücreler üzerinde NO üretim kapasitesini düşürdüğü gözlemlenirken B.*meltensis* bakterisinin NO seviyesini düşürmediği gözlemlenmiştir. Burada aynı zamanda B.*abortus* kaynaklı OMV'lerinde NO üretim kapasitesini azalttığı gözlemlenmiş ve inaktif B.*melitensis* kaynaklı eksozomlarında NO seviyelerini düşürdüğü analiz edilmiştir.

B.*abortus* ve B.*melitensis* hücre içinde benzer mekanizmalar ile hareket etmektedir. Fakat buna rağmen monosit ya da makrofajlar üzerinde NO ve ROS üretimini baskılama da gösterebilmektedirler.

6. KAYNAKLAR

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783–801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015

Alaidarous, M., Ve, T., Casey, L. W., Valkov, E., Ericsson, D. J., Ullah, M. O., et al. (2014). Mechanism of bacterial interference with TLR4 signaling by *Brucella* toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein Tcp B. J. Biol. Chem. 289, 654–668. DOI: 10.1074/jbc.M113.523274

Alaniz, R. C., Deatherage, B. L., Lara, J. C., & Cookson, B. T. (2007). Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of Salmonella typhimurium that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 179(11), 7692–7701. DOI: 10.4049/jimmunol.179.11.7692

Andersen-Nissen, E., Smith, K. D., Strobe, K. L., Barrett, S. L. R., Cookson, B. T., Logan, S. M., & Aderem, A. (2005). Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. Proceedings of the national academy of sciences, 102(26), 9247-9252. DOI: 10.1073/pnas.0502040102

Araj, G. F. (2010). Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. International journal of antimicrobial agents, 36, S12-S17. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.014

Arenaccio, C., Chiozzini, C., Columba-Cabezas, S., Manfredi, F., Affabris, E., Baur, A., & Federico, M. (2014). Exosomes from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells license quiescent CD4+ T lymphocytes to replicate HIV-1 through a Nef-and ADAM17-dependent mechanism. Journal of virology, 88(19), 11529-11539. DOI: 10.1128/jvi.01712-14

Atri, C., Guerfali, F. Z., & Laouini, D. (2018). Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. International journal of molecular sciences, 19(6), 1801. DOI: 10.3390/ijms19061801

Avila-Calderón, E. D., Flores-Romo, L., Sharon, W., Donis-Maturano, L., Becerril-García, M. A., Arreola, M. G. A., ... & Contreras-Rodríguez, A. (2020). Dendritic cells and *Brucella* spp. interaction: the sentinel host and the stealthy pathogen. Folia microbiologica, 65, 1-16. DOI: 10.1007/s12223-019-00691-6

Baldwin, C. L., & Goenka, R. (2006). Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection?. *Critical reviews in immunology*, *26*(5), 407–442. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v26.i5.30

Barley, T. J., Murphy, P. R., Wang, X., Bowman, B. A., Mormol, J. M., Mager, C. E., ... & Liu, Y. (2022). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 controls PD-L1 expression by regulating type I interferon during systemic Escherichia coli infection. Journal of Biological Chemistry, 298(5). DOI: 10.1016/j.jbc.2022.101938

Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D. S., Guzman-Verri, C., Chacon-Diaz, C., Rucavado, A., ... & Moreno, E. (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. DOI: 10.1371/journal.pone.0000631

Barrionuevo, P., and Giambartolomei, G. H. (2019). Inhibition of antigen presentation by *Brucella*: many more than many ways. Microbes Infect. 21, 136–142. DOI: 10.1016/j.micinf.2018.12.004

Bhagyaraj, E., Wang, H., Yang, X., Hoffman, C., Akgul, A., Goodwin, Z. I., et al. (2021). Mucosal vaccination primes NK cell-dependent development of CD8+ T cells against pulmonary *Brucella* infection. Front. Immunol. 12:697953. DOI:

10.3389/fimmu.2021.697953
Bishop, D. G., & Work, E. (1965). An extracellular glycolipid produced by Escherichia coli grown under lysine-limiting conditions. Biochemical Journal, 96(2), 567. DOI: 10.1042/bj0960567
Blenkiron, C., Simonov, D., Muthukaruppan, A., Tsai, P., Dauros, P., Green, S., ... & Phillips, A. R. (2016). Uropathogenic Escherichia coli releases extracellular vesicles that are associated with RNA. PloS one, 11(8), e0160440. DOI: 10.1371/journal.pone.0160440
Botos, I., Segal, D. M., & Davies, D. R. (2011). The structural biology of Toll-like receptors. *Structure (London, England: 1993)*, *19*(4), 447–459. DOI: 0.1016/j.str.2011.02.004
Bottero, D., Gaillard, M. E., Zurita, E., Moreno, G., Martinez, D. S., Bartel, E., ... & Hozbor, D. (2016). Characterization of the immune response induced by pertussis OMVs-based vaccine. *Vaccine*, *34*(28), 3303-3309. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.04.079
Bottero, D., Gaillard, M. E., Zurita, E., Moreno, G., Martinez, D. S., Bartel, E., ... &
Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(10), 620-630. DOI: 10.1038/nrmicro3480
Cai, X., Chiu, Y. H., & Chen, Z. J. (2014). The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Molecular cell*, *54*(2), 289–296. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.040
Cardoso, P.G., Macedo, G.C., Azevedo, V. *et al. Brucella spp* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact* **5**, 13 (2006). DOI: 10.1186/1475-2859-5-13
Celli J., de Chastellier C., Franchini D.-M., Pizarro-Cerda J., Moreno E., Gorvel J.-P. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. J. Exp. Med. 2003;198:545–556. DOI: 10.1084/jem.20030088.
Celli, J. (2019). The intracellular life cycle of *Brucella* spp. Microbiology spectrum, 7(2), 10-1128. DOI: 10.1128/microbiolspec.bai-0006-2019
Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of experimental medicine*, *198*(4), 545–556. DOI: 10.1084/jem.20030088
Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. International immunopharmacology, 23(1), 37-45 DOI: 10.1016/j.intimp.2014.08.002.
Chatterjee, S. N., & Das, J. (1967). Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by Vibrio cholerae. Microbiology, 49(1), 1-11. DOI: 10.1099/00221287-49-1-1
Chen, Q., Lai, S., Yin, W., Zhou, H., Li, Y., Mu, D., ... & Yang, W. (2016). Epidemic characteristics, high-risk townships and space-time clusters of human brucellosis in Shanxi Province of China, 2005–2014. BMC Infectious Diseases, 16, 1-10. DOI: 10.1186/s12879-016-2086-x
Chi H, Pepper M, Thomas PG. Principles and therapeutic applications of adaptive immunity. Cell. 2024 Apr 25;187(9):2052-2078. DOI: 10.1016/j.cell.2024.03.037. PMID: 38670065; PMCID: PMC11177542.

Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fischer, H., Stappert, D., Wantia, N., Rodriguez, N., Wagner, H., Svanborg, C., & Miethke, T. (2008). Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nature medicine*, *14*(4), 399–406. DOI: 10.1038/nm1734
Comerci DJ, Martínez-Lorenzo MJ, Sieira R., Gorvel JP, Ugalde RA Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella* abortus-containing vacuole. Cell. mıcrobıology 2001;3:159–168. DOI: 10.1046/j.1462-5822.2001.00102.x.
Cong, L., Gao, Z., Zheng, Y., Ye, T., Wang, Z., Wang, P., ... & Yang, L. (2020). Electrical stimulation inhibits Val-boroPro-induced pyroptosis in THP-1 macrophages via sirtuin3 activation to promote autophagy and inhibit ROS generation. Aging (Albany NY), 12(7), 6415. Doı: 10.18632/aging.103038
Copin R, Vitry M-A, Hanot Mambres D, Machelart A, De Trez C, Vanderwinden J-M, et al. (2012) In Situ Microscopy Analysis Reveals Local Innate Immune Response Developed around *Brucella* Infected Cells in Resistant and Susceptible Mice. PLoS Pathog 8(3): e1002575. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002575
Dauros-Singorenko, P., Blenkiron, C., Phillips, A., & Swift, S. (2018). The functional RNA cargo of bacterial membrane vesicles. FEMS microbiology letters, 365(5), fny023. DOI: 10.1093/femsle/fny023
Deatherage, B. L., & Cookson, B. T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. Infection and immunity, 80(6), 1948-1957. DOI: 10.1128/iai.06014-11
Delpino, M. V., Fossati, C. A., & Baldi, P. C. (2009). Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with Brucella spp. Infection and immunity, 77(3), 984-995. DOI: 10.1128/iai.01259-08
Delrue RM, Martinez-Lorenzo M., Lestrate P., Danese I., Bielarz V., Mertens P., De Bolle X., Tibor A., Gorvel JP, Letesson JJ Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking Cell. mıcrobıology. 2001;3:487–497. DOI: 10.1046/j.1462-5822.2001.00131.x.
DeVoe, I. W., & Gilchrist, J. E. (1975). Pili on meningococci from primary cultures of nasopharyngeal carriers and cerebrospinal fluid of patients with acute disease. Journal of Experimental Medicine, 141(2), 297-305. DOI: 10.1084/jem.141.2.297
Diacovich, L., & Gorvel, J. P. (2010). Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. Nature Reviews Microbiology, 8(2), 117-128.
Dorward, D. W., Garon, C. F., & Judd, R. C. (1989). Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of Neisseria gonorrhoeae. Journal of bacteriology, 171(5), 2499-2505. DOI: 10.1128/jb.171.5.2499-2505.1989
Dowling, D. J., Sanders, H., Cheng, W. K., Joshi, S., Brightman, S., Bergelson, I., ... & Levy, O. (2016). A meningococcal outer membrane vesicle vaccine incorporating genetically attenuated endotoxin dissociates inflammation from immunogenicity. Frontiers in immunology, 7, 562. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00562
Dudek, A. M., Martin, S., Garg, A. D., & Agostinis, P. (2013). Immature, semi-mature, and fully mature dendritic cells: toward a DC-cancer cells interface that augments anticancer immunity. Frontiers in immunology, 4, 438. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00438
Durward, M., Radhakrishnan, G., Harms, J., Bareiss, C., Magnani, D., & Splitter, G. A. (2012). Active evasion of CTL mediated killing and low quality responding CD8+ T cells contribute to persistence of brucellosis. PloS one, 7(4), e34925. DOI:

doi.org/10.1371/journal.pone.0034925
Ellis, T. N., & Kuehn, M. J. (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. Microbiology and molecular biology reviews, 74(1), 81-94. DOI: 10.1128/mmbr.00031-09
Erkyihun, G. A., Gari, F. R., & Kassa, G. M. (2022). Bovine brucellosis and its public health significance in Ethiopia. Zoonoses, 2(1). DOI: 10.15212/ZOONOSES-2022-0005
Felix, C., Kaplan Türköz, B., Ranaldi, S. *et al.* The *Brucella* TIR domain containing proteins BtpA and BtpB have a structural WxxxE motif important for protection against microtubule depolymerisation. *Cell Commun Signal* **12**, 53 (2014). DOI: 10.1186/s12964-014-0053-y
Forestier, C., Deleuil, F., Lapaque, N., Moreno, E., and Gorvel, J. P. (2000). *Brucella* abortus lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. J. Immunol. 165, 5202–5210. DOI: 10.4049/jimmunol.165.9.5202
Gamazo, C., & Moriyon, I. (1987). Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella* melitensis cells. *Infection and immunity*, *55*(3), 609-615. DOI: 10.1128/iai.55.3.609-615.1987
Gayathiri, E., Bharathi, B., & Priya, K. (2018). Study of the enumeration of twelve clinical important bacterial populations at 0.5 McFarland standard. Int. J. Creat. Res. Thoughts (IJCRT), 6(2), 880-893.
Gharavi, A. T., Hanjani, N. A., Movahed, E., & Doroudian, M. (2022). The role of macrophage subtypes and exosomes in immunomodulation. Cellular & Molecular Biology Letters, 27(1), 83. DOI: 10.1186/s11658-022-00384-y
Godfroid, J., Al Dahouk, S., Pappas, G., Roth, F., Matope, G., Muma, J., ... & Skjerve, E. (2013). A "One Health" surveillance and control of brucellosis in developing countries: moving away from improvisation. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 36(3), 241-248. DOI: 10.1016/j.cimid.2012.09.001
Gomes, M. T., Campos, P. C., de Almeida, L. A., Oliveira, F. S., Costa, M. M., Marim, F. M., et al. (2012). The role of innate immune signals in immunity to *Brucella abortus*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2:130. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00130
Gomes, M. T., Campos, P. C., de Almeida, L. A., Oliveira, F. S., Costa, M. M., Marim, F. M., et al. (2012). The role of innate immune signals in immunity to *Brucella abortus*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2:130. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00130
Gorvel, J.-P. (2008). *Brucella: A Mr "Hide" converted into Dr Jekyll*. Microbes and Infection, 10(9), 1010–1013. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.07.011
Grant, B. D., & Donaldson, J. G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature reviews Molecular cell biology*, *10*(9), 597-608. DOI: 10.1038/nrm2755
Grilló, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., Moriyón, I., & Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model?. Veterinary research, 43(1), 29. DOI: 10.1186/1297-9716-43-29
Grilló, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., Moriyón, I., & Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model?. Veterinary research, 43, 1-35. DOI: 10.1186/1297-9716-43-29
Guerrero-Mandujano, A., Hernández-Cortez, C., Ibarra, J. A., & Castro-Escarpulli, G. (2017). The outer membrane vesicles: secretion system type zero. Traffic, 18(7), 425-432. DOI: 10.1111/tra.12488
Guo, X., Zeng, H., Li, M., Xiao, Y., Gu, G., Song, Z., ... & Jiao, H. (2023). The

mechanism of chronic intracellular infection with Brucella spp. Frontiers in cellular and infection microbiology, 13, 1129172. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1129172
Guo, X., Zeng, H., Li, M., Xiao, Y., Gu, G., Song, Z., Shuai, X., Guo, J., Huang, Q., Zhou, B., Chu, Y., & Jiao, H. (2023). The mechanism of chronic intracellular infection with *Brucella* spp. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 1129172. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1129172
Haurat, M. F., Elhenawy, W., & Feldman, M. F. (2015). Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles. Biological chemistry, 396(2), 95-109. DOI: 10.1515/hsz-2014-0183
Hu, M.-M., & Shu, H.-B. (2018). Cytoplasmic mechanisms of recognition and defense of microbial nucleic acids. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 34, 357–379. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062903
Irving, A. T., Mimuro, H., Kufer, T. A., Lo, C., Wheeler, R., Turner, L. J., ... & Kaparakis-Liaskos, M. (2014). The immune receptor NOD1 and kinase RIP2 interact with bacterial peptidoglycan on early endosomes to promote autophagy and inflammatory signaling. *Cell host & microbe*, *15*(5), 623-635. DOI: 10.1016/j.chom.2014.04.001
Jakka, P., Namani, S., Murugan, S., Rai, N., and Radhakrishnan, G. (2017). The *Brucella* effector protein Tcp B induces degradation of inflammatory caspases and thereby subverts non-canonical inflammasome activation in macrophages. J. Biol. Chem. 292, 20613–20627. DOI: 10.1074/jbc.M117.815878
Janeway Jr, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). The major histocompatibility complex and its functions. In Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. Garland Science.
Jiao, H., Zhou, Z., Li, B., Xiao, Y., Li, M., Zeng, H., ... & Gu, G. (2021). The mechanism of facultative intracellular parasitism of Brucella. International journal of molecular sciences, 22(7), 3673. DOI: 10.3390/ijms22073673
Johnson, A., Lewis, J., & ALBERTS, B. (2002). Molecular biology of the cell. DOI:
Jubier-Maurin V, Boigegrain RA, Cloeckaert A, Gross A, Alvarez-Martinez MT, Terraza A, Liautard J, Köhler S, Rouot B, Dornand J, Liautard JP. Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. Infect Immun. 2001 Aug;69(8):4823-30. DOI: 10.1128/IAI.69.8.4823-4830.2001. PMID: 11447156; PMCID: PMC98570.
K. Hoebe, E. Janssen, B. Beutler The interface between innate and adaptive immunity Nature Immunology, 5 (2004), pp. 971-974
Kadurugamuwa, J. L., & Beveridge, T. J. (1995). Virulence factors are released from Pseudomonas aeruginosa in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *Journal of bacteriology*, *177*(14), 3998-4008. DOI: 10.1128/jb.177.14.3998-4008.1995
Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *science*, *367*(6478), eaau6977. DOI: 10.1126/science.aau6977
Kaparakis-Liaskos, M., & Ferrero, R. L. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. Nature Reviews Immunology, 15(6), 375-387. DOI: 10.1038/nri3837
Kaparakis-Liaskos, M., & Ferrero, R. L. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. Nature Reviews Immunology, 15(6), 375-387. DOI:

10.1038/nri3837
Kaparakis, M., Turnbull, L., Carneiro, L., Firth, S., Coleman, H. A., Parkington, H. C., ... & Ferrero, R. L. (2010). Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. Cellular microbiology, 12(3), 372-385. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01404.x
Khan, M. Y., Mah, M. W., & Memish, Z. A. (2001). Brucellosis in pregnant women. Clinical infectious diseases, 32(8), 1172-1177. DOI: 10.1086/319758
Knox, K., Vesk, M., & Work, E. (1966). Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, *92*(4), 1206-1217. DOI: 10.1128/jb.92.4.1206-1217.1966
Krylova, S. V., & Feng, D. (2023). The machinery of exosomes: biogenesis, release, and uptake. *International journal of molecular sciences*, *24*(2), 1337. DOI: 10.3390/ijms24021337
Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. Annual review of microbiology, 64(1), 163-184. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413
Kurmanov, B., Zincke, D., Su, W., Hadfield, T. L., Aikimbayev, A., Karibayev, T., ... & Blackburn, J. K. (2022). Assays for identification and differentiation of Brucella species: a review. Microorganisms, 10(8), 1584. DOI: 10.3390/microorganisms10081584
Kurmanov, B., Zincke, D., Su, W., Hadfield, T. L., Aikimbayev, A., Karibayev, T., ... & Blackburn, J. K. (2022). Assays for identification and differentiation of Brucella species: a review. Microorganisms, 10(8), 1584. DOI: 10.3390/microorganisms10081584
Lacerda, T. L. S., Salcedo, S. P., & Gorvel, J.-P. (2013). *Brucella* T4SS: The VIP pass inside host cells. Current Opinion in Microbiology, 16(1), 45–51. DOI: 10.1016/j.mib.2013.01.001
Lai, S., Chen, Q., & Li, Z. (2021). Human Brucellosis: An Ongoing Global Health Challenge. China CDC weekly, 3(6), 120–123. DOI: 10.46234/ccdcw2021.031
Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E., Hunter, J., Schirm, M., Paquet, C., ... & Paramithiotis, E. (2007). Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *Journal of proteome research*, *6*(4), 1519-1529. DOI: 10.1021/pr060636a
Lapaque, N., Takeuchi, O., Corrales, F., Akira, S., Moriyon, I., Howard, J. C., & Gorvel, J.-P. (2005). *Differential inductions of TNF-α and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides*. Cellular Microbiology, 7(11), 1611–1621. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00629.x
Li T. The functions of polycomb group proteins in T cells. Cell Insight. 2022 Jul 21;1(5):100048. DOI: 10.1016/j.cellin.2022.100048. PMID: 37193554; PMCID: PMC10120301.
Luo X, Zhang X, Wu X, Yang X, Han C, Wang Z, Du Q, Zhao X, Liu SL, Tong D, Huang Y. *Brucella* Downregulates Tumor Necrosis Factor-α to Promote Intracellular Survival *via* Omp25 Regulation of Different MicroRNAs in Porcine and Murine Macrophages. Front Immunol. 2018 Jan 17;8:2013. DOI: 10.3389/fimmu.2017.02013. PMID: 29387067; PMCID: PMC5776175.
Machelart, A., Khadrawi, A., Demars, A., Willemart, K., De Trez, C., Letesson, J. J., & Muraille, E. (2017). Chronic *Brucella* infection induces selective and persistent

interferon gamma-dependent alterations of marginal zone macrophages in the spleen. Infection and immunity, 85(11), 10-1128. DOI: 10.1128/IAI.00115-17
Martirosyan, A., & Gorvel, J.-P. (2013). *Brucellaevasion of adaptive immunity*. *Future Microbiology, 8(2), 147–154.* DOI:10.2217/fmb.12.140
Martirosyan, A., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. Immunological reviews, 240(1), 211-234. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x
Martirosyan, A., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunological reviews*, *240*(1), 211–234. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x
Martirosyan, A., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular Brucella pathogen. Immunological reviews, 240(1), 211-234. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x
Matle, I., Ledwaba, B., Madiba, K., Makhado, L., Jambwa, K., & Ntushelo, N. (2021). Characterisation of Brucella species and biovars in South Africa between 2008 and 2018 using laboratory diagnostic data. Veterinary Medicine and Science, 7(4), 1245-1253. DOI: 10.1002/vms3.483
McFarland, J. (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. Journal of the American Medical Association, 49(14), 1176-1178. DOI: 10.1001/jama.1907.25320140022001f
Medina, K. L. 2016. Overview of the immune system. In Handbook of Clinical Neurology (Vol. 133, pp. 61–76). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-444-63432-0.00004-9
Mergenhagen, S. E., Bladen, H. A., & Hsu, K. C. (1966). ELECTRON MICROSCOPIC LOCALIZATION OF ENDOTOXIC LIPOPOLYSACCHARIDE IN GRAM-NEGAGIVE ORGANISMS. Annals of the New York Academy of Sciences, 133(2), 279-291. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1966.tb52371.x
Murray, P. J. (2017). Macrophage polarization. Annual review of physiology, 79, 541-566. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339
N. Lapaque, O. Takeuchi, F. Corrales, S. Akira, I. Moriyon, J.C. Howard, et al. Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides Cellular Microbiology, 8 (2006), pp. 401-413 DOI: doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00629.x
Newman RM, Salunkhe P, Godzik A, Reed JC. Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins. Infect Immun. 2006 Jan;74(1):594-601. DOI: 10.1128/IAI.74.1.594-601.2006. PMID: 16369016; PMCID: PMC1346628.
Oliveira, S. C. (2021). Host immune responses and pathogenesis to Brucella spp. infection. Pathogens, 10(3), 288. DOI: 10.3390/pathogens10030288
Olsen, S. C., & Palmer, M. V. (2014). Advancement of knowledge of Brucella over the past 50 years. Veterinary pathology, 51(6), 1076-1089. DOI: 10.1177/0300985814540545
P. Pasquali, A.M. Thornton, S. Vendetti, C. Pistoia, P. Petrucci, M. Tarantino, *et al.* CD4+CD25+ T regulatory cells limit effector T cells and favor the progression of brucellosis in BALB/c mice Microbes and Infection, 12 (2010), pp. 3-10 DOI: 10.1016/j.micinf.2009.09.005
Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E. V. (2006). The

new global map of human brucellosis. The Lancet infectious diseases, 6(2), 91-99.
Pollak, C. N., Delpino, M. V., Fossati, C. A., & Baldi, P. C. (2012). Outer membrane vesicles from Brucella abortus promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. PloS one, 7(11), e50214. DOI: 10.1371/journal.pone.0050214
Pollak, C. N., Delpino, M. V., Fossati, C. A., & Baldi, P. C. (2012). Outer membrane vesicles from Brucella abortus promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. PloS one, 7(11), e50214. DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0050214
Potter, M. E. (2013). Foodborne Infections and Intoxications: Chapter 15. Brucellosis. Elsevier Inc. Chapters.
Pritsch, M., Ben-Khaled, N., Chaloupka, M., Kobold, S., Berens-Riha, N., Peter, A., ... & Wieser, A. (2016). Comparison of intranasal outer membrane vesicles with cholera toxin and injected MF59C. 1 as adjuvants for malaria transmission blocking antigens AnAPN1 and Pfs48/45. *Journal of immunology research*, *2016*(1), 3576028. DOI: 10.1155/2016/3576028
Qu, M., Zhu, H., & Zhang, X. (2022). Extracellular Vesicles-Mediated Regulation of Macrophage Polarization in Bacterial Infections. Frontiers in Microbiology, 4995. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1039040
Qureshi, K. A., Parvez, A., Fahmy, N. A., Abdel Hady, B. H., Kumar, S., Ganguly, A., ... & Aspatwar, A. (2023). Brucellosis: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment–a comprehensive review. Annals of medicine, 55(2), 2295398. DOI: 10.1080/07853890.2023.2295398
Radhakrishnan, G. K., & Splitter, G. A. (2010). Biochemical and functional analysis of TIR domain containing protein from *Brucella melitensis.* Biochemical and biophysical research communications, 397(1), 59-63. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.05.056
Recent advancement, immune responses, and mechanism of action of various vaccines against intracellular bacterial infections Life Sciences, 314 (2023), Article 121332
Renelli, M., Matias, V., Lo, R. Y., & Beveridge, T. J. (2004). DNA-containing membrane vesicles of Pseudomonas aeruginosa PAO1 and their genetic transformation potential. Microbiology, 150(7), 2161-2169. DOI: 10.1099/mic.0.26841-0
Roa-Vidal, N., Rodríguez-Aponte, A. S., Lasalde-Dominicci, J. A., Capó-Vélez, C. M., & Delgado-Vélez, M. (2023). Cholinergic polarization of human macrophages. International Journal of Molecular Sciences, 24(21), 15732. DOI: 10.3390/ijms242115732
Roop, R. M., Barton, I. S., Hopersberger, D., and Martin, D. W. (2021). Uncovering the hidden credentials of *Brucella* virulence. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 85, e00021–e00019. DOI: 10.1128/MMBR.00021-19
Rothfield, L., & Pearlman-Kothencz, M. (1969). Synthesis and assembly of bacterial membrane components: a lipopolysaccharide-phospholipid-protein complex excreted by living bacteria. *Journal of molecular biology*, *44*(3), 477-492. DOI: 10.1016/0022-2836(69)90374-X
Salcedo, S. P., Chevrier, N., Lacerda, T. L., Ben Amara, A., Gerart, S., Gorvel, V. A., de Chastellier, C., Blasco, J. M., Mege, J. L., & Gorvel, J. P. (2013). Pathogenic *Brucella* replicate in human trophoblasts. *The Journal of infectious diseases*, *207*(7), 1075–1083. DOI: 10.1093/infdis/jit007

Salcedo, S. P., Marchesini, M. I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., et al. (2008). *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp 1. PLoS Pathog. 4:e21. DOI: 10.1371/journal.ppat.0040021
Sartorio, M. G., Pardue, E. J., Feldman, M. F., & Haurat, M. F. (2021). Bacterial outer membrane vesicles: from discovery to applications. Annual review of microbiology, 75(1), 609-630. DOI: 10.1146/annurev-micro-052821-031444
Schooling, S. R., & Beveridge, T. J. (2006). Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *Journal of bacteriology*, *188*(16), 5945-5957. DOI: 10.1128/jb.00257-06
Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. Nature reviews microbiology, 13(10), 605-619. DOI: 10.1038/nrmicro3525
Sedzicki J, Tschon T, Low SH, Willemart K, Goldie KN, Letesson JJ, Stahlberg H, Dehio C. 3D correlative electron microscopy reveals continuity of *Brucella*-containing vacuoles with the endoplasmic reticulum. J Cell Sci. 2018 Feb 22;131(4):jcs210799. DOI: 10.1242/jcs.210799. PMID: 29361547.
Serafino, A., Marin Franco, J. L., Maio, M., Trotta, A., Genoula, M., Castillo, L. A., ... & Milillo, M. A. (2022). *Brucella abortus* RNA does not polarize macrophages to a particular profile but interferes with M1 polarization. PLOS Neglected Tropical Diseases, 16(11), e0010950. DOI: 10.1371/journal.pntd.0010950
Shen, Y., Torchia, M. L. G., Lawson, G. W., Karp, C. L., Ashwell, J. D., & Mazmanian, S. K. (2012). Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. Cell host & microbe, 12(4), 509-520. DOI: 10.1016/j.chom.2012.08.004
Shengnan, S. O. N. G., Yajun, Y. A. N. G., Jiang, H., Meihua, Y. A. N. G., & Yuanzhi, W. A. N. G. (2021). Deletion of lpsA gene of *Brucella melitensis* strain M5-90 promotes caspase-11 induced non-classical pathways pyroptosis in *Brucella*-infected mouse macrophage cells. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 27(1). DOI: 10.9775/kvfd.2020.24820
Shu, H. B., Takeuchi, M., & Goeddel, D. V. (1996). The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(24), 13973–13978. DOI: 10.1073/pnas.93.24.13973
Siadat, S. D., Salmani, A. S., & Aghasadeghi, M. R. (2012). Brucellosis vaccines: an overview. Zoonosis. Croatia: Intech, 143-66.
Smirnova, E. A., Vasin, A. V., Sandybaev, N. T., Klotchenko, S. A., Plotnikova, M. A., Chervyakova, O. V., ... & Kiselev, O. I. (2013). Current methods of human and animal brucellosis diagnostics. DOI: 10.4236/aid.2013.33026
Snyder, G. A., Deredge, D., Waldhuber, A., Fresquez, T., Wilkins, D. Z., Smith, P. T., et al. (2014). Crystal structures of the toll/Interleukin-1 receptor (TIR) domains from the *Brucella* protein Tcp B and host adaptor TIRAP reveal mechanisms of molecular mimicry. J. Biol. Chem. 289, 669–679. DOI: 10.1074/jbc.M113.523407
Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. Traffic. 2008 May;9(5):678-94. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2008.00718.x. Epub 2008 Feb 4. PMID: 18266913.
T. Xia, X. Yi, X. Wu, J. Shang, & H. Shu, PTPN1/2-mediated dephosphorylation of MITA/STING promotes its 20S proteasomal degradation and attenuates innate

antiviral response, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 116 (40) 20063-20069, DOI: 10.1073/pnas.1906431116 (2019).
Tan, K., Li, R., Huang, X., & Liu, Q. (2018). Outer membrane vesicles: current status and future direction of these novel vaccine adjuvants. *Frontiers in microbiology*, *9*, 783. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00783
Tavasolian, F., Hosseini, A. Z., Rashidi, M., Soudi, S., Abdollahi, E., Momtazi-Borojeni, A. A., ... & Sahebkar, A. (2021). The impact of immune cell-derived exosomes on immune response initiation and immune system function. Current pharmaceutical design, 27(2), 197-205. DOI: 10.2174/1381612826666201207221819
Velásquez, L. N., Milillo, M. A., Delpino, M. V., Trotta, A., Mercogliano, M. F., Pozner, R. G., et al. (2017). Inhibition of MHC-I by *Brucella abortus* is an early event during infection and involves EGFR pathway. Immunol. Cell Biol. 95, 388–398. DOI: 10.1038/icb.2016.111
Verdiguel-Fernández L, Oropeza-Navarro R, Ortiz A, Robles-Pesina MG, Ramírez-Lezama J, Castañeda-Ramírez A, Verdugo-Rodríguez A. *Brucella melitensis omp*31 Mutant Is Attenuated and Confers Protection Against Virulent *Brucella melitensis* Challenge in BALB/c Mice. J Microbiol Biotechnol. 2020 Apr 28;30(4):497-504. DOI: 10.4014/jmb.1908.08056. PMID: 31986561; PMCID: PMC9728373.
Verstak B, Nagpal K, Bottomley SP, Golenbock DT, Hertzog PJ, Mansell A. MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP interaction with TRAF6 is critical for TLR2- and TLR4-mediated NF-kappaB proinflammatory responses. J Biol Chem. 2009 Sep 4;284(36):24192-203. doi: 10.1074/jbc.M109.023044. Epub 2009 Jul 10. PMID: 19592497; PMCID: PMC2782013. DOI: 10.1074/jbc.M109.023044
Wang Z, Wang G, Wang Y, Liu Q, Li H, Xie P, Wang Z. Omp31 of *Brucella* Inhibits NF-κB p65 Signaling Pathway by Inducing Autophagy in BV-2 Microglia. Neurochem Res. 2021 Dec;46(12):3264-3272. DOI: 10.1007/s11064-021-03429-4. Epub 2021 Sep 18. PMID: 34536195.
Weiss, G., & Schaible, U. E. (2015). Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. Immunological reviews, 264(1), 182-203. DOI: 10.1111/imr.12266.
Woodman, P. G., & Futter, C. E. (2008). Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. Current opinion in cell biology, 20(4), 408-414. DOI: 10.1016/j.ceb.2008.04.001
X. Xiong, B. Li, Z. Zhou, G. Gu, M. Li, J. Liu, *et al.* The VirB system plays a crucial role in *Brucella* intracellular infection International Journal of Molecular Sciences, 22,13637 (2021) DOI:10.3390/ijms222413637
Xiao, Y., Li, M., Guo, X., Zeng, H., Shuai, X., Guo, J., ... & Jiao, H. (2022). Inflammatory mechanism of Brucella infection in placental trophoblast cells. International Journal of Molecular Sciences, 23(21), 13417. DOI: 10.3390/ijms232113417
Xin Wu, Caoqi Lei, Tian Xia, Xuan Zhong, Qing Yang, Hong-Bing ShuRegulation of TRIF-mediated innate immune response by K27-linked polyubiquitination and deubiquitination. Nat Commun 10, 4115 (2019). DOI: 10.1038/s41467-019-12145-1
Xin Wu, Caoqi Lei, Tian Xia, Xuan Zhong, Qing Yang, Hong-Bing ShuRegulation
Y. Ke, Y. Wang, W. Li, Z. Chen Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 5 (2015), p. 72
Yang, J., Wang, Y., Hou, Y., Sun, M., Xia, T., & Wu, X. (2024). *Evasion of host*

defense by Brucella. Cell Insight, 3(1), 100143. DOI: 10.1016/j.cellins.2024.100143
Yanık, A. (2024). Bruselloz Hastalarında Serum sTREM-1, Presepsin ve IFN-Gama Düzeylerinin Tanıdaki Yeri. Mikrobiyol Bul, 58(4), 422-432. DOI: 10.5578/mb.20249699
Yasin, Z. N. M., Idrus, F. N. M., Hoe, C. H., & Yvonne-Tee, G. B. (2022). Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review. Differentiation. DOI: 10.1016/j.diff.2022.10.001
Yi, J., Wang, Y., Zhang, H., Deng, X., Xi, J., Li, H., ... & Chen, C. (2021). Interferon-inducible transmembrane protein 3-containing exosome as a new carrier for the cell-to-cell transmission of anti-Brucella activity. Frontiers in Veterinary Science, 8, 642968. DOI: 10.3389/fvets.2021.642968
Zhong, B., Tien, P., & Shu, H.-B. (2006). Innate immune responses: Crosstalk of signaling and regulation of gene transcription. Virology, 352(1), 14–21. DOI: 10.1016/j.virol.2006.03.031

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

ahpC&D: Alkil Hidroperoksit Redüktaz (Alkyl Hydroperoxide Reductase)
ALR: AIM2 benzeri Reseptöerler (AIM2-like Receptors)
APC: Antijen Sunan Hücreler (Antigen-Presenting Cells)
BCV: *Brucella* İçeren Vakuol (*Brucella*-Containing Vacuole)
BiP: Bağlayıcı İmmünoglobulin Proteini (Binding Immunoglobulin Protein)
BSA: Sığır Serum Albümini (Bovine Serum Albumin)
BtpA: *Brucella* TIR Domain içeren Protein A (*Brucella* TIR domain-containing Protein A)
BtpB: *Brucella* TIR Domain içeren Protein B (*Brucella* TIR domain-containing Protein B)
bvfA: *Brucella* Virülans Faktörü (*Brucella* Virulence Factor)
C-DCFDA: 2′,7′-Diklorodihidroflüorescein diasetat (2′,7′-Dichlorodihydrofluorescein diacetate)
CFU: Koloni Oluşturan Birim (coloni forming unit)
cGAS: Siklik GMP-AMP Sentaz (Cyclic GMP-AMP Synthase)
CLR: C tipi Lektin Reseptöleri (C-type Lectin Receptors)
cydDCAB: Sitokrom Oksidaz (Cytochrome Oxidase)
CβG: Siklik Beta-1, 2 – Glukan (Cyclic Beta-1,2-Glucan)
DAF-DA: 4,5-Diaminofluorescein diasetat solüsyon (4,5-Diaminofluorescein diacetate)
DH: Dendritik Hücreler (Dendritic Cells)
Dir: floresans 1,1-dioktadesil-3,3,3,3-tetrametilindotrikarbosiyanin iyodür (Fluorescent 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanine Iodide)
DMSO: Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide)
DNA: Deoksiribonükleik Asit (Deoxyribonucleic Acid)
eBCV: Endosomal *Brucella* İçeren Vakuol (Endosomal *Brucella*-Containing Vacuole)
ECL: Geliştirilmiş Kemilüminesans (Enhanced Chemiluminescence)
EEA1: Erken Endozom Antijeni 1 (Early Endosome Antigen 1)
EpCAM: Epitel Hücre Adezyon Molekülü (Epithelial Cell Adhesion Molecule)
ER: Endoplazmik Retikulum (Endoplasmic Reticulum)
EV: Hücre Dışı Veziküller (Extracellular Vesicles)
FBS: Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)
HRP: Yaban turpu peroksidazı (Horseradish Peroxidase)
Hsp60: Isı Şoku pProteini 60 (Heat Shock Protein 60)
IFN-γ: İnterferon Gamma
IgG: İmmünoglobulin G
IL: İnterlökin (Interleukin)
IRE1: İnozitol Gerektiren Enzim 1 (Inositol-Requiring Enzyme 1)
IκBα: κB Protein Alfa İnhibitörü (Inhibitor of κB Protein Alpha)
Ikκ: IκB Kinaz (IκB Kinase)
LPS: Lipopolisakkarit (Lipopolysaccharide)
MAL: MyD88-Adaptör Benzeri (MyD88-Adaptor-Like)
MFU: McFarland Standardı
MHC: Majör Histokompatibilite Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)
MV: Membran Vezikülleri (Membrane Vesicles)
MVB: Geç Endosom (Late Endosome)
MYd88: Miyeloid Farklılaşma Yanıt Geni 88 (Myeloid Differentiation Primary

Response Gene 88)
NF-κB: Aktive B hücrelerinin kappa hafif zincir arttırıcısının Nükleer Faktörü (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NK: Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer Cells)
NLR: NOD-benzeri Reseptör (NOD-like Receptors)
NO: Nitrik Oksit (Nitric Oxide)
norD: Nitrik Oksit Redüktaz (Nitric Oxide Reductase)
NP-2: Nötrofil Peptit 2 (Neutrophil Peptide 2)
OMP: Dış Zar Protein (Outer Membrane Protein)
OMV: Dış Membran Vezikülleri (Outer Membrane Vesicles)
PAMP: Patojen ile İlişkili Moleküler Paternler (Pathogen-Associated Molecular Patterns)
PBS: Fosfat Tamponlanmış Tuz Çözeltisi (Phosphate-Buffered Saline)
PM: Plazma Membranı (Plasma Membrane)
PMA: Forbol 12-Miristat 13- Asetat (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)
PMN: Polimorfonükleer Hücreler (Polymorphonuclear Cells)
PrPC: Hücresel Prion Proteini (Cellular Prion Protein)
PRR: Örüntü Tanıma Reseptörleri (Pattern Recognition Receptors)
PVDF: Poliviniliden Florür (Polyvinylidene Fluoride)
Rab5: Ras ile ilişkili protein Rab-5 (Ras-related protein Rab-5)
RIPA: Radyo-İmmünopresipitasyon Testi (Radio-Immunoprecipitation Assay)
RLR: RIG-I benzeri Reseptörler (RIG-I-like Receptors)
RNA: Ribonükleik asit (Ribonucleic Acid)
ROS: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
RPMI: Roswell Park Memorial Institute 1640
SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
STL: Sitotoksik T Hücresi (Cytotoxic T Cell)
T4SS: Tip IV Salgı Sistemi (Type IV Secretion System)
TBS-T: Tween-20 içeren Tris-Tamponlu Salin (Tris-Buffered Saline with Tween-20)
TcpB: TIR içeren protein B (TIR-containing protein B)
TE: Trofoblastik Hücreler (Trophoblastic Cells)
Th1: T Yardımcı Hücre Tipi 1 (T Helper Type 1 Cells)
TIR: Toll/IL-1 Reseptör (Toll/Interleukin-1 Receptor)
TIR: Toll/İnterlökin-1 reseptörü (Toll/Interleukin-1 Receptor)
TIRAP: Toll–IL-1 Reseptör Alanı İçeren Adaptör Protein (Toll–IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Protein)
TLR: Toll Benzeri Reseptör (Toll-like Receptor)
TNF-α: Tümör Nekroz Faktörü Alfa (Tumor Necrosis Factor Alpha)
TRPS: Ayarlanabilir Dirençli Darbe Algılama (Tunable Resistive Pulse Sensing)
UPR: Katlanmamış Protein Yanıtı (Unfolded Protein Response)
VceC: Virülans ile ilişkili kromozomal olarak kodlanmış C proteini (Virulence-associated chromosomally encoded C protein)
Vir: Virulans Protein (Virulence Protein)
VjbR: VirB ile ilişkili düzenleyici (VirB-associated regulator)
XBP1: X-box Bağlayıcı Protein 1 (X-box Binding Protein 1)

8. TEŞEKKÜR

Stajerliğimden yüksek lisans sürecime, yüksek lisans sürecimden tez sürecime kadar bana yalnızca akademik rehberlik sağlamakla kalmayıp, anlayışı, sabrı ve desteği ile her zaman yol gösteren değerli danışmanım Prof. Dr. H. Barbaros ORAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Akademik gelişimime katkıları sayesinde bu süreci daha öğretici ve verimli bir hale getirdim. Tüm emeği için minnettarım.

Tez projemde yer alan Doç. Dr. Diğdem YÖYEN ERMİŞ'e stajerliğimden bu yana bilimsel merakımı canlı tutmamı sağlayan yönlendirmeleri ve zor zamanlarımda gösterdiği anlayış ve desteği için teşekkür ederim.

Bölümümüzün kıymetli hocalarından ve tez projemde yer alan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, anlayışlı, motive edici yaklaşımı için Dr. Öğr. Üyesi S. Haldun BAL'a en içten şekilde teşekkür ederim.

Ek olarak tez projemde yer alan mikrobiyoloji alanı ile ilgili desteklerini ve bilgilerini her zaman benimle paylaşan Prof. Dr. Cüneyt ÖZAKIN'a ve Doç. Dr. Nazmiye Ülkü TÜZEMEN'e bana sağladıkları destek için teşekkür ederim.

Ayrıca bu zamana kadar ki bütün deney süreçlerimde, psikolojik savaşlarımda, gözlerim dolduğunda ya da immünoloji laboratuvarına girdiğim günden beri yüzümü gülümseten her süreçte yanımda oldukları için başta ablam Gözde ARSLAN, Fatmanur DÜNDAR ve tüm ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Liseden bu zamana kadar her mutluluğumu, derdimi rahatça anlattığım her zaman canla başla yanımda olmaya devam eden bütün telefonlarıma cevap verip saatlerce anlattığım her şeyi sabırla dinleyen canım arkadaşım Ece ORHAN DUVAR'a yüksek lisans sürecimde de yanımda olduğu için teşekkür ederim.

Her zaman düştüğümde beni kaldıran, kim olduğumu, inadımı hatırlatıp beni kendime getiren sevindiğimde benim gözümdeki ışık ile mutlu olan aileme, annem Emine ESEN, babam Hakan ESEN, kardeşim Erol Efe ESEN'e maddi, manevi tüm destekleri için teşekkür ederim.

Yıllardır bütün kahrımı çekip, ruh 90alimi her zaman hisseden, beni desteklemeye devam eden, her zaman çok anlayışlı davranarak beni hep ayakta tutan hem psikolojik hem fiziksel olarak hep yanımda, arkamda, her baktığım yerde bulduğum hayat arkadaşım, nişanlım Ilgın KİREZ'e çok teşekkür ederim.

Çalışmamız, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 222S919 Numaralı proje ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Ek olarak bu çalışma, Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TYL-2024-1666 numaralı lisansüstü tez projesi ve TAY-2022-601 numaralı altyapı projesi ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü BUÜ BAP birimine teşekkürlerimi sunarım.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı- Soyadı: Ceren ESEN
Doğum Yeri- Tarihi:
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lisans: Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen ve Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2017- 2021)
Yüksek Lisans: Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı (2022-Halen)
e-posta:
Adres: Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı 16059, Görükle Kampüs/Bursa/TÜRKİYE

ULUSAL/ ULUSLARARASI SUNUMLAR:

Doku Yerleşik/İnfiltre Makrofajların İzolasyonu ve Organ Nişleri Korunarak Gerçekleştirilen 3 Boyutlu Hücre Kültürü Ortamında Büyütülmesi,
Dündar F., Etgü O., **Esen C.,** Yağcıoğlu B., Özalp E., Oral B., Yöyen Ermiş D., 2023, XXVI. Ulusal immünoloji kongresi Poster Sunumu

İnaktif *Brucella* ve İnaktif *Brucella*'ya Maruz Bırakılmış Makrofajlardan Köken Alan Eksozomlarin Makrofaj Polarizasyonuna Etkisi,
Esen C., Bal H., Tüzemen Ü., Yöyen-Ermiş D., Özakın C., Oral B., 2024, 5. Uluslararası Aşı Bilimi Kongresi Sözlü Sunum

Can Exosomes Isolated from Erythrocyte Suspensions Lead to Suppression of T Lymphocyte Proliferation?
Bal H., Yöyen-Ermiş D., Arslan G., **Esen C.,** Aydın Y., Aytoğu G., Yeşilbağ K., Heper Y., Oral B., 2024, Extracellular Vesicle Conference Poster Sunumu

Eritrosit Süspansiyonlarından Elde edilen Eksozomların T lenfosit Proliferasyonu üzerindeki etkisinde lökoredüksiyonun rolü.
Bal H., Yöyen-Ermiş D., Arslan G., **Esen C.,** Aydın Y., Aytoğu G., Yeşilbağ K., Heper Y., Oral B., 2024, XVII Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi Sözlü Sunum (En iyi 1. Sözlü bildiri ödülü)

Development of Ara-C Loaded Exosomes: Next-Generation Nanotherapeutic Approaches in AML Therapy.
Atmaca S., Muçaj S., **Esen C.,** Özküçük Y., Demir E. T., Eylem C., Nemutlu E., Yöyen-Ermiş D., Esendağlı G., Timür S. S., 2025, JOINT EUFEPS – ÖPhG MEETING Sözlü Sunum