

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BRUSELLOZA KARŞI AŞI GELİŞTİRİLMESİNDE
ANTİJEN YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN
İMMÜNOSTİMÜLAN ETKİNLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

Sedanur ÖZTAV

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Eş Danışman

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK

Temmuz, 2023

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BRUSELLOZA KARŞI AŞI GELİŞTİRİLMESİNDE
ANTİJEN YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN
İMMÜNOSTİMÜLAN ETKİNLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

Sedanur ÖZTAV tarafından hazırlanan tez çalışması 11.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Serap ACAR DERMAN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üye. Sinem ÖKTEM OKULLU, Üye
Acıbadem Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Bruselloza Karşı Aşı Geliştirilmesinde Antijen Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin İmmünostimülan Etkinliklerinin İncelenmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Sedanur ÖZTAV



Bu çalışma, Doç. Dr. Tülin ÖZBEK yürütücülüğündeki Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FBA-2022-4648 numaralı, “Brusellozis hastalığına karşı rekombinant antijenik proteinlerini içeren nanoformülasyonların eldesi ve in vitro/in vivo değerlendirilmesi” adlı proje ve TÜBİTAK Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı (2210/C) kapsamında desteklenmiştir.



Aileme

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca çok kıymetli bilgi birikimini, deneyimlerini, yol göstericiliğini ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sn. Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a, eş danışmanım Sn. Doç. Dr. Tülin ÖZBEK'e, Sn. Doç. Dr. Serap ACAR DERMAN'a ve Dr. Öğr. Üye. Sinem ÖKTEM OKULLU'ya,

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde fikir ve bilgi birikimleriyle daima yanımda olan Sahar DİNPARVAR'a, hayvan deneylerinin gerçekleştirilmesinde büyük emeği ve desteği olan Buşra AKGÜL'e, Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı ekip arkadaşlarıma,

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesine imkân veren Yıldız Teknik Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne, bu süreçte bana ve yüksek lisans tezime destek veren TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na,

Eğitim hayatım boyunca daima yanımda olan, sevgisini ve desteğini esirgemeyen annem Nuray ÖZTAV'a, babam Yılmaz ÖZTAV'a, ablam Şeyma Nur ÖZTAV'a, kardeşim Kübranur ÖZTAV'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Sedanur ÖZTAV

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	4
1.3 Hipotez.....	6
2 GENEL BİLGİLER	8
2.1 <i>Brucella abortus</i> Tarihçesi.....	8
2.2 <i>Brucella abortus</i> Morfolojisi.....	9
2.3 <i>Brucella abortus</i> Biyolojisi.....	9
2.4 <i>Brucella abortus</i> Patogenezi.....	11
2.5 <i>Brucella abortus</i> Virülans Faktörleri.....	12
2.6 <i>Brucella abortus</i> Hücre İçi Etkileşimleri.....	17
2.7 Bruselloz Epidemiyoloji ve Coğrafi Dağılımı.....	18
2.8 Bruselloz Bulaş Yolları.....	19
2.9 <i>Brucella abortus</i> Kültür ve Üreme Özellikleri.....	20
2.10 Bruselloz Enfeksiyonu ve Tanı.....	21
2.11 Bruselloz Tedavisi.....	24
2.12 Bruselloz ve Aşılar.....	27
2.13 Poli (laktik asit-KO-glikolik asit) (PLGA).....	29
3 MATERYAL VE METOD	30
3.1 Materyal.....	30
3.2 Metod.....	35
4 SONUÇ	52
4.1 Nanoformülasyonların ve Rekombinant Proteinlerin RAW 264.7 Fare Makrofaj Hücreleri Üzerinde Sitotoksosite Analizlerinin Sonuçları.....	52
4.2 Nanoformülasyonların ve Rekombinant Proteinlerin RAW 264.7 Fare Makrofaj Hücreleri Üzerinde Nitrik Oksit Analizlerinin Sonuçları.....	54
4.3 Kan Serumlarından Antikor Miktarlarının Tayini.....	55

4.4 Deney Hayvanları Splenositlerinin Kùltürünün Yapılması ve Nanoformùlasyonlar, Rekombinant Proteinler ile İndüklenmesi.....	56
4.5 Sitokin Tayini Sonuçları.....	57
4.6 <i>Brucella abortus</i> 'a Karşı Koruma Deneyi Sonuçları.....	64
KAYNAKÇA	73
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	83



SİMGELİSTESİ

°C	Celsius
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
μM	Mikromolar
rpm	Bir Dakikada Gerçekleşen Dönüş/Devir Sayısı
μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram

KISALTMA LİSTESİ

aBVC	Otofajik <i>Brucella</i> İçeren Vakuoller
CO ₂	Karbondioksit
CYP450	Sitokrom P 450
CYP2C9	Sitokrom P450 ailesi 2 alt ailesi C üyesi 9
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EEA1	Erken Endozom Antijeni
ER	Endoplazmik Retikulum
Ig	İmmunoglobulin
IFN- γ	İnterferon Gama
IL-12	İnterlökin-12
IL-10	İnterlökin-10
IL-4	İnterlökin-4
Kob	Koloni Oluşturan Birim
LAMP-1	Lizozom İlişkili Membran Proteini
LPS	Lipopolisakkarit
MHC Complex)	Büyük Doku Uyuşum Kompleksi (Major Histocompatibility
NO	Nitrik Oksit
OmpC	Dış Membran Porin C
OmpF	Dış Membran Porin F
PABA	P-Aminobenzoik Asit
PLGA	Poli (laktik asit-KO-glikolik asit)
Rab5	Ras İlişkili Protein 5
Rab7	Ras İlişkili Protein 7
rBVC	Replikatif <i>Brucella</i> İçeren Vakuoller
rEipB	Rekombinant EipB
R-LPS	Rough-LPS
ROI	Reaktif Oksijen Ara Maddeleri
rOmp25	Rekombinant Omp25
S-LPS	Smooth-LPS
SOD	Süperoksit Dismutaz
TLR2	Toll Benzeri Reseptör-2 (Toll Like Receptor-2)
TLR4	Toll Benzeri Reseptör-4 (Toll Like Receptor-4)

TLR9	Toll Benzeri Reseptör-9 (Toll Like Receptor-9)
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
T4SS	Tip 4 Sekresyon Sistemi (Type 4 Secretion System)
Topo IV	Topoizomeraz IV
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	<i>Brucella</i> bakterisinin mikroskop altındaki gram boyama görüntüsü....	9
Şekil 2.2	<i>Brucella</i> bakterisinin hücre içi nişleri ve rezervuarları.....	11
Şekil 2.3	Makrofaj hücreleri içindeki etkileşimlerini gösteren <i>Brucella</i> modeli	17
Şekil 2.4	<i>Brucella</i> bulaş yolları	19
Şekil 3.1	Thoma lamı çizgi görünümü	37
Şekil 3.2	RAW 264.7 fare makrofaj hücreleri ters mikroskop görüntüsü (10x).	38
Şekil 3.3	Nitrik oksit standartları kalibrasyon eğrisi.....	40
Şekil 3.4	Deney hayvanlarının gruplandırılması.....	42
Şekil 4.1	RAW-264.7 hücreleri üzerinde sitotoksite analiz sonuçları.....	52
Şekil 4.2	RAW-264.7 hücreleri üzerinde NO tayini sonuçları	54
Şekil 4.3	Kan serumlarındaki antikor miktarları	55
Şekil 4.4	Fare dalağından elde edilen hücrelerin ters mikroskop görüntüsü (10x)	56
Şekil 4.5	IFN- γ standart grafiği.....	57
Şekil 4.6	Fare dalaklarındaki IFN- γ sitokin konsantrasyonları.....	58
Şekil 4.7	TNF- α standart değerleri.....	59
Şekil 4.8	Fare dalaklarındaki TNF- α sitokin konsantrasyonları	60
Şekil 4.9	IL-12 sitokin standart değerleri.....	61
Şekil 4.10	Fare dalaklarındaki IL-12 sitokin konsantrasyonları	62
Şekil 4.11	IL-4 standart değerleri.....	63
Şekil 4.12	Fare dalaklarındaki IL-4 sitokin değerleri	64
Şekil 4.13	Kanlı agara ekimi gerçekleştirilen dalak örneklerinin inkübasyon sonrası görüntüleri.....	66
Şekil 4.14	<i>Brucella abortus</i> gram boyama sonucu ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	68
Şekil 4.15	Üreaz test sonucu renk değişimleri.....	69

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	Deney hayvanlarını gruplandırma tablosu	41
Tablo 3.2	96 kuyulu plakaya kaplama yapılması için antijenlerin gruplandırılması	43
Tablo 4.1	Yayma metoduyla kanlı agara ekimi gerçekleştirilen dalak örneklerindeki <i>Brucella abortus</i> üreme miktarlarının gruplara göre koloni sayıları.....	66
Tablo 4.2	Biyokimyasal test sonuçları	69



Bruselloza Karşı Aşı Geliştirilmesinde Antijen Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin İmmünostimülan Etkinliklerinin İncelenmesi

Sedanur ÖZTAV

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Eş-Danışman: Doç. Dr. Tülin ÖZBEK

Ülkemizde Bruselloz, hayvancılıkta ciddi kayıplara sebep olan zoonotik bir hastalıktır. Mevcut Bruselloz aşıları istenmeyen durumlara sebebiyet verdiğinden Bruselloz'a karşı güçlü ve güvenli aşı adaylarının geliştirilmesi gerekmektedir. Bu ihtiyaç doğrultusunda bu tez çalışmasının amacı, Bruselloz'a karşı *Brucella abortus*'a ait Omp25 ve EipB rekombinant proteinlerinin PLGA nanopartiküllerine enkapsüle edilmesiyle oluşturulmuş formülasyonların aşı adayı olarak etkinliklerinin in vitro ve in vivo incelenmesidir. Bu proteinlerden EipB literatürde ilk kez rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilmiş ve bu iki protein ilk kez PLGA polimerlerine yüklenerek nanoformülasyonları hazırlanmıştır. Üretilen nanopartiküllerin RAW-264.7 makrofaj hücreleri üzerinde in vitro sitotoksiteleri, immünostimülan etkinlikleri incelenmiş ve uygun konsantrasyonlar seçilerek in vivo çalışmalara geçiş yapılmıştır. Serbest halde bulunan proteinler ve protein yüklü nanopartiküller BALB/c farelere enjekte edilmiştir. ELISA metodu ile fare

kan serum örneklerindeki antikor seviyeleri belirlenmiş ve anlamlı düzeyde artış gözlemlendiğinde farelerin sakrifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücresel immün yanıtın ise Th1 yönünde ilerlemesi beklendiğinden, ELISA kitleri kullanılarak farelerin dalaklarından elde edilmiş splenositlerde IL-12, TNF- α ve IFN- γ ile IL-4 sitokin miktarlarının tayini gerçekleştirilmiştir. Eş zamanlı olarak fare dalaklarından kanlı agara ekim yapılmıştır. Kanlı agardaki koloniler üzerinde yapılan gram boyama ve biyokimyasal analiz sonuçlarıyla mevcut kolonilerin *Brucella* bakterisine ait olduğu doğrulanmıştır. Formülasyonların enjekte edildiği gruptaki koloni sayılarında kontrol grubuna göre 60 kata varan düşüşler tespit edilmiştir. Sitokin miktarları değerlendirildiğindeyse hücresel bağışıklık yanıtının Th1 yönünde indüklendiği görülmüştür. Protein yüklü PLGA nanoformülasyonlarının diğer formülasyonlara göre bağışıklık sistemini nispeten daha az indüklediği belirlenmiştir. Bu durumun kontrollü salım sisteminden kaynaklandığı öngörülmektedir. Mevcut sonuçlar incelendiğinde, ilk kez üretilmiş olan EipB rekombinant proteininin immünostimulan etkinliğinin var olduğu, Omp25 proteini ile kullanıldığında da kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde hümmoral ve hücresel bağışıklık sistemini indüklediği görülmüştür. Hem nanoformülasyonlar hem de serbest haldeki proteinlerden oluşan formülasyonların Th1 yanıtını indüklediği, hümmoral ve hücresel yanıtlar göz önüne alındığında EipB proteininin Omp25 gibi *Brucella abortus* bakterisine karşı yürütülen aşı çalışmalarında PLGA ile kontrollü salım sistemlerinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Brucella*, EipB, Omp25, nanopartikül, PLGA

Investigation of Immunostimulating Activities of Antigen-Loaded Polymeric Nanoparticles in Vaccine Development Against Brucellosis

Sedanur OZTAV

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emrah Sefik ABAMOR

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Tulin OZBEK

Brucellosis is a zoonotic disease that causes serious losses in livestock in our country. Since the existing Brucellosis vaccines cause undesirable situations, new vaccine candidates are needed. With this need, the aim of this thesis is to examine the in vitro and in vivo efficacy of formulations formed by encapsulating Omp25 and EipB recombinant proteins of *Brucella abortus* into PLGA nanoparticles as vaccine candidates. EipB was obtained for the first time by recombinant DNA technology, and Omp25 were loaded into PLGA polymers for the first time. Cytotoxicity and immunostimulatory activities of formulations on RAW-264.7 macrophage cells were examined for appropriate concentrations and in vivo studies were performed. Free proteins and protein-loaded nanoparticles were injected into BALB/c mice. When a significant increase of antibody levels was observed via the ELISA method, mice were sacrificed. IL-12, TNF- α , IFN- γ , and IL-4 cytokine amounts were determined in the splenocytes of mice using ELISA kits. Simultaneously, mouse spleens were seeded on blood agar. The analysis results on the colonies confirmed that the existing colonies belonged to *Brucella* bacteria. In

all groups, a decrease of up to 60 times was observed in the number of colonies compared to the control group. With cytokine amounts, it was observed that the cellular immune response was induced in the direction of Th1. It has been determined that protein-loaded PLGA nanoformulations have lower efficiency because of the controlled release system. It was observed with current results, the EipB recombinant protein had immunostimulant activity. When used with the Omp25 protein, it induced the humoral and cellular immune system at a significant level. It has been shown that all formulations induce the Th1 response, and considering the humoral and cellular responses, EipB protein can be used in controlled release systems with PLGA in vaccine studies against *Brucella abortus* bacteria such as Omp25.

Keywords: Brucella, EipB, Omp25, nanoparticle, PLGA

1.1 Literatür Özeti

Bruselloz tüm dünyada sıklıkla rastlanılan yaygın bir zoonozdur. Hastalığın görülme düzeyi ülkelerin gelişmişlik seviyesine göre farklılık göstermekle beraber Bruselloz hastalığına sebep olan ajan *Micrococcus melitensis*, 1886 yılında Malta adasındaki askeri birliklerde görülen enfeksiyonun araştırılması neticesinde Yunan Doktor Themistokles Zammit ve İngiliz Doktor David Bruce tarafından keşfedilmiştir. Süt ürünleri tüketiminin fazla olduğu, hayvan sağlığının yeterli düzeyde korunmadığı Orta Doğu, Akdeniz Kıyıları, Asya, Afrika, Güney ve Orta Amerika'da görülen endemik bir zoonozdur [1]. Malta humması olarak da adlandırılan Bruselloz hastalığını Dünya Sağlık Örgütü (WHO) en yaygın zoonoz olarak değerlendirirken bu zoonozun keşfinin üzerinden yüzyılı aşkın süre geçmiş ve kapsamlı araştırmalar yapılmış olmasına rağmen *Brusella* hayvanlar için hala ciddi bir patojen olmaya devam etmekte ve dünya çapında maddi manevi kayıplara sebep olmaktadır [2, 3].

Gram negatif bakteriler sınıfına mensup olan *Brusella*, farklı türlerdeki hayvanları enfekte etmekte olup konak olarak seçtiği bu hayvan türlerine göre kendisi de gruplandırılmaktadır: *B. abortus*, sığırlar; *B. melitensis*, koyun ve keçiler; *B. suis*, domuzlar; *B. ovis*, koyunlar; *B. canis*, köpekler; *B. neotomae*, çöl fareleri. Son çalışmalarla farklı canlılardan izole edilen *B. inopinata*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. papionis*, *B. vulpis* gibi türlerin de dahil olmasıyla *Brusella* tür sayısı on ikiye yükselmiştir [2, 4]. İlk genomu 2002 yılında yayınlanmış olan bu bakterinin bugün zoonotik türlerinin başında gelen *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* için 1500'ün üzerinde genom izole edilmiştir. Bütün bu çalışmalara rağmen *Brusella* bakterisinin farklı konakları tercih etme sebepleri tamamen çözümlenememiştir. Fakat bu bakteriler yeni konakçıya uyum sağlama eğiliminde olan bakteriler olup birincil konakçılara doğrudan veya dolaylı temas yoluyla ya da bazen kasıtsız olarak bulaşmaktadır [3, 4]. İnsanlarda da görülen bu hastalık hayvanlarda ciddi üreme sorunlarına neden olduğundan ekonomik olarak büyük kayıplara sebep olmaktadır [5]. İnsanlara bulaş yolları; kontamine et ve süt ürünlerinin tüketilmesi,

inhalasyon ile enfeksiyözlerin alınması, enfekte hayvanların kan veya dokularının konjonktival yahut bütünlüğü bozulmuş deri ile teması olarak sıralanabilir. Hayvanlarla çalışan meslek gruplarından veteriner hekimler, mezbaha çalışanları, et endüstrisinde çalışanlar da Bruselloz hastalığına yakalanma olasılığına sahipken laboratuvarda *Brusella* bakterisi ile çalışanlar da enfeksiyona yakalanma ihtimali olan grupta yer almaktadır [6]. Özellikle *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* ve sığırlarda görülüp düşüğe sebep olan *B. abortus* da insanlar için risk teşkil etmektedir [1].

Bruselloz vakalarında sıklıkla rastlanılan semptomlara yüksek ateş, iştahsızlık, gece terlemesi, yorgunluk, halsizlik, eklem ve karın ağrısı, kilo kaybedilmesi örnek olarak verilebilir [7]. Kesin tanının konulmasında sıklıkla başvuru yöntemler bakterinin kan ve dokulardan izolasyonudur ve izolasyonun gerçekleştirilemediği durumlarda Bruselloz'un varlığını düşündüren klinik bulgulara ek olarak serolojik testlerin yapılması ve PCR yardımı ile de tanı kesinleştirilebilir [8, 9]. Akut Bruselloz tanısının konulmasında kullanılan serolojik testlerden serum aglütinasyon testi (SAT)'nde 1/160 üzerindeki titre ve mevcut klinik bulgular yeterli görülmektedir. Ancak blokan antikor ve antikor fazlalığı durumlarında SAT neticesinde yalancı negatiflik görülme ihtimaline karşı farklı dilüsyonlarla test gerçekleştirilmektedir [9]. Hastaların laboratuvarındaki test sonuçlarında çeşitli hepatobiliyer enzim yükseklikleri, kemik iliği süpresyonu temelli lökopeni, anemi ve trombositopeni de gözlemlenebilir. Adı geçen test sonuçlarından da anlaşılacağı üzere Bruselloz tıp alanında pek çok branşı ilgilendirmekte ve dünya çapında güncelliğini korumaktadır [7].

Bruselloz terapötik stratejilere olumlu yanıt veren ve nadiren ölüme sebep olan bir hastalık olmasına rağmen yalnızca antibiyotik tedavisi yeterli olmamaktadır. Benzer şekilde oksitetrasiklin, rifampin, doksisisiklin gibi ajanların tek başına kullanımı da yeterli gelmemekte ve %9-25 gibi yüksek oranlarda hastalığın nüksetmesine sebep olmaktadır [10]. Bu noktada tedavinin uzatılması da tatmin edici sonuçlar vermediğinden tek çeşit antibiyotik kullanımı yerine ikili antibiyotik kullanımlarında ise monoterapiye göre daha iyi sonuçlar alınmıştır. Nüksetme oranlarının daha düşük çıkmasıyla göze çarpan üçlü antibiyotik kombinasyonları ise hastalığın tedavisinde ikili antibiyotik kombinasyonlarına göre avantaj sağlayamamakta ve kısa vadede daha az etkili olduğu görülmektedir [11]. Bir diğer

tedavi yaklaşımı ise *Brucella* içeren vakuollerin ER ile bağlantısının tekrar modellenmesidir ki bu durum katlanmamış protein stresi olarak adlandırılan ER stresi ile ilişkili olan hücresel stres boyunca ER'nin modifikasyonunu gerektirir [12]. *Teucrium polium*, *Scophularia deserti*, *Alhagi*, *Eucalyptus* gibi bitkiler üzerinde gerçekleştirilen bir dizi araştırma da Bruselloz tedavisinde umut vaat etmektedir [13]. Ancak pek çok hastalıkta olduğu gibi Bruselloz için de enfeksiyona yakalanmadan korunma sağlanması hedeflenmektedir. İnsanlar için Bruselloz'dan korunmak adına etkili bir aşı yoktur fakat hayvanlarda koruma sağlayan ve mevcut durumda kullanılan canlı, atenüe aşılar (canlı *B. abortus* aşısı straini 19 ve RB51, canlı *B. melitensis* aşısı straini Rev-1) bulunmaktadır. Bu aşılarından referans olarak kabul edilen S19 pek çok gelişmiş ülkede kullanılmaktayken aşının istenmeyen bir durumu olarak gebe hayvanlarda düşüğe sebep olduğu ve insanlar için öldürücü etki gösterdiği tespit edilmiştir [14, 15]. *B. abortus* S19, *B. abortus*'un biovar 1 suşunun normal özelliklerine sahiptir ancak büyüme koşullarında CO₂ gereksinimi duymaması gibi farklılıkları vardır. Bazı gelişmiş ülkelerde aşı adayı olarak S19'un yerini alan RB51 ise orijinal olarak *B. abortus* suşu 2308'in rifampisine dirençli bir mutantından türetilmiştir. Oldukça kararlı olan RB51 straininin abortif özelliği neredeyse hiç yoktur veya oldukça azaltılmıştır. RB51 suşu tarafından indüklenen koruyucu etkinlik ve bağışıklık, S19 tarafından indüklenen değerlere yakın olduğu yahut daha yüksek olduğu kaydedilmiştir [16]. S19 ve RB51 dışında inaktive aşılar, sentetik peptit aşılar, vektör yoluyla bulaşan *Brusella* aşılar, DNA ve alt ünite aşılar da yürütülen çalışmalara örnek olarak verilebilir [14]. Alt ünite aşılarının ise canlı aşılarla göre nispeten güvenilir olduğu, immün sistemin uyarılmasında saflaştırılmış proteinler ve DNA kullanıldığından enfeksiyon riski taşımadığı kanıtlanmıştır. Araştırmacılar ise canlı aşılar ve canlı aşılarının insan enfeksiyonlarına karşı koruma uygulamaları üzerindeki çalışmalarına devam etmektedirler [15].

Subunit aşılarının canlı atenüe aşılarla göre daha etkili bir alternatif olarak düşünüldüğü bu noktada, dikkat çeken belli başlı *Brucella* dış membran proteinlerinden Omp25 üzerine de araştırmalar yürütülmektedir [17]. Omp25 proteini *Brucella* türlerinde, biovar ve strainlerinde sağlam bir şekilde korunmuş olarak görülmektedir [18]. Konak hücreye bağlanmaktan ve invazyondan sorumlu olan bu protein *Brucella* patogeneğinde enfeksiyon boyunca önemli bir rol

oynamakta ve TNF- α sitokin salımını indüklediği, immunojen etkisi olduğu kanıtlanan bir protein olarak değerlendirilmektedir [18-20]. Bir diğer *Brucella* proteini olan, korunmuş bir DUF1849 -ailesi proteini EipB'nin, hücre içi patojenlerin monofiletik bir grubu olan *Brucella*'nın periplazmik boşluğuna salgılandığı da gösterilmiştir. EipB'nin silinmesi, in vitro *Brucella* hücre zarfı bütünlüğünde ve bir *B. abortus* enfeksiyonu fare modelinde dalak kolonizasyonunun korunmasında kusurlara neden olmaktadır. Bakteri periplazmik boşluğunda yer alan EipB proteininin, kapsül bütünlüğünün korunmasını sağlayarak memeli canlılarda bakterinin sağ kalımını arttırdığı ve böylece bakteri patogeneğinde rol aldığı da gösterilmektedir. [21]. Bahsi geçen *Brucella* proteinlerinden Omp25 gibi proteinler çeşitli enkapsülasyon çalışmalarında yer almakta ve bu kapsülasyonlarda çeşitli polimerlerden yararlanılmaktadır. Bu polimerlerden birisi olan non-toksik, biyobozunur ve biyoyumlu PLGA, kontrollü salım sistemlerinde uzun yıllardır kullanılmaktadır [22]. İnsanlarda ve hayvanlarda güvenilir bir şekilde kullanılmasının yanı sıra makrofaj ve dendritik hücreler üzerinde immünostimulan etki göstermesi sebebiyle PLGA, FDA tarafından adjuvan olarak tanımlanmaktadır. Omp25 proteininin kitosan gibi başka materyaller ile enkapsülasyonu yapılmış olsa dahi EipB proteiniyle beraber PLGA ile enkapsülasyonu üzerine bir çalışma henüz gerçekleştirilmemiştir. [23]. Bu bağlamda düşünüldüğünde, dış membran proteini olan Omp25 ve periplazmik boşluğa salgılanan EipB proteinlerinin PLGA ile enkapsülasyonunun yapılmamış olması bu sahada yürütülecek çalışmalara fikir oluşturmaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacını; *B. abortus*'a karşı yeni bir aşı formülasyonu geliştirilmesine katkı sağlamak amacıyla elde edilmiş olan rekombinant EipB ve rekombinant Omp25 proteinlerinin, proteinlerin PLGA polimeri ile nanoformülasyonlarının in vitro ve in vivo çalışmalarda immünostimulan etkinliklerinin incelenmesi oluşturmaktadır. Aynı zamanda bu çalışmada rEipB proteininin antijenik özelliğinin rOmp25 proteini ile in vitro ve in vivo çalışmalar kapsamında kıyaslanarak tespit edilmesi, PLGA ile enkapsüle edilmiş proteinlerin enkapsüle olmamış proteinlere nazaran in vitro nitrik oksit üretme potansiyelleri ile in vivo hümmoral ve hüccresel bağışıklığı indükleme oranlarının elde edilmesi

hedeflenmektedir. İn vivo çalışmalar kapsamında mevcut proteinlerin ve protein-PLGA nanoformülasyonlarının immünostimulan etkinliklerinin tayin edilmesi, koruma deneyi kapsamında gerçekleştirilen *B. abortus* enjeksiyonu akabinde immünize olan ve olmayan gruplardaki *B. abortus* varlığının incelenmesi de bu tez çalışmasının amaçları arasında yer almaktadır.

Bu tez çalışmasının amacına ulaşması için aşağıdaki araştırmalar gerçekleştirilmiştir:

-FBA-2022-4648 projesi kapsamında sentezlenmiş olan rekombinant proteinlerin PLGA ile enkapsüle edilmiş ve edilmemiş formülasyonlarının in vitro çalışmalar ile RAW-264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksosite tayinlerinin gerçekleştirilmesi ve biyolojik sistemde kullanılabilirliklerinin analiz edilmesi,

-Sitotoksosite sonuçlarından elde edilen rEipB ve rOmp25 proteinlerinin nontoksik konsantrasyonlarının RAW-264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki nitrik oksit üretme potansiyelinin Griess reaksiyonu ile tayin edilmesi,

-PLGA ile enkapsüle olan ve olmayan formülasyonların in vitro çalışmalardan elde edilen nontoksik konsantrasyonlarının in vivo çalışmalar kapsamında BALB/c farelere belirli aralıklarla enjekte edilmesi,

-Farelerin antikor yanıtlarının belirlenmesi için serum örneklerinin alınması ve serumlarda *B. abortus*'a karşı oluşan antikor titrelerinin ELISA yöntemi ile belirlenmesi,

-Serumlarda antikor varlığı saptandıktan sonra koruma deneyi kapsamında farelere belirlenen miktarlarda *B. abortus* enjeksiyonunun yapılması,

-Koruma deneyinden bir ay sonra farelerin sakrifikasyonunun gerçekleştirilmesi, kanlarının ve dalaklarının alınması,

-Alınan kan ve dalaklardaki *B. abortus* varlığının kanlı agarda araştırılması,

-Elde edilen dalaklardan hücre süzgeci yardımıyla splenositlerin izole edilerek kültürünün yapılması ve PLGA ile enkapsüle olan/olmayan rekombinant proteinlerle muamele edilerek süpernatantların toplanması,

-Toplanan süpernatantlarda sitokin varlığının araştırılması için ELISA kitleri ile belirlenen sitokin tayinlerinin yapılması,

-Rekombinant Omp25 ve EipB proteinleri ile immünize edilmiş, PLGA ile enkapsüle edilen rOmp25 ve rEipB ile immünize edilmiş, immünize edilmemiş gruplardaki farelerin hümmoral ve hüccresel yanıtları karşılaştırılarak incelenmiş ve analiz edilmiştir.

1.3 Hipotez

B. abortus bakterisine karşı immünizasyonda ölkemizde de kullanılan S19 aşısı canlı zayıflatılmış bir aşıdır ve belirli kısıtlamaları mevcuttur. Bu kısıtlamaların en bilineni literatürde de göröldüğü gibi gebe hayvanlarda yavru atımına sebep olmasıdır. Serolojik tanıda yanlış sonuçlara neden olması, insanlar üzerinde bir yıl koruma sağlamasına rağmen ciddi duyarlılık gelişmesine sebebiyet vermesi de kısıtlamalarına dahildir. Bu amaçla yürütölen *B. abortus* için aş çalışmalarında son yıllarda rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak elde edilen rekombinant alt ünite aşlar karşımıza çıkmaktadır. Yeni bir alt ünite aşının geliştirilmesi içinse yeni antijenlerin tanımlanması gerekmektedir. Başarılı bir alt ünite aşının temelini doğru seçilmiş antijenlerin Th1 bağışıklık yanıtını harekete geçirmesi oluşturmaktadır. *B. abortus* bakterisinden elde edilen pek çok antijenden en önemli sonuçların yüzey antijenlerinden elde edildiğı, tür ve biyotipe göre farklılık göstermekle beraber yapısında barındırdığı LPS tabakası sebebiyle immün cevaba neden olduğı yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Bu yüzey antijenlerinden Omp25 proteini pek çok çalışmada araştırılmış ve antijenik özelliğı kanıtlanmıştır. EipB proteini ise bakterinin konak hücrede sağıkalımında rol oynayan, kapsül korunumunda aktif olarak yer alan bir proteindir ve ilk kez izole edilmiştir. Bir diğertaraf tan son yıllarda yapılan çalışmalara antijenlerin nanopartiköller aracılığıyla lenfoid organlara ve fizyolojik sistemde hedeflenen bölgelere daha rahat taşınması, nanopartiköl içindeki etken maddenin salım süresi sebebiyle hedeflenen organa erişimi sağılanana kadar nanopartiköl içinde korunması gibi sebeplerden PLGA polimerinden yararlanılmaktadır. Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasının hipotezini;

-*B. abortus* bakterisine ait Omp25 proteinin antijenik özelliğinin literatürde gösterilmiş olması,

-Nanoformülasyonların ilaç taşıyıcı sistemlerde kontrollü salımı sağladığının bilinmesi,

-Nanopartikülün içindeki kapsüle edilen maddenin degradasyondan korunması, istenilen bölgenin daha rahat hedeflenebilmesi,

-Bugüne kadar Bruselloz proteinlerinden olan Omp25 ve EipB'nin PLGA nanopartiküllerine kapsüle edilmemiş olması,

-Polimerik taşıyıcı sistemlerin olumlu özelliklerine bağlı olarak tek başına antijen uygulamalarıyla kıyaslandığında nanoformülasyonların daha yüksek düzeyde immün yanıt ve Th1 yanıtını uyarmasının beklenmesi,

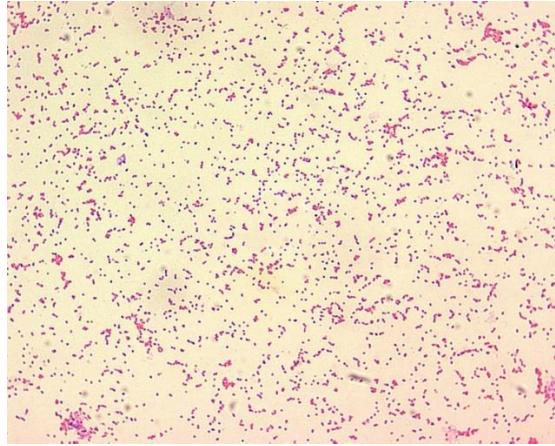
-PLGA da kendi içinde adjuvan özellik gösterdiğinden immün yanıtı olumlu yönde etkilemesinin beklentisi oluşturmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında literatürdeki çalışmalardan farklı olarak yeni bir formülasyon geliştirilmesine katkı sağlamak amacıyla elde edilecek olan rEipB ve rOmp25 proteinlerinin PLGA ile nanoformülasyon haline getirilmiş hallerinin in vitro ve in vivo çalışmalarda immünostimulan etkinliklerinin incelenmesi hedeflenmektedir. REipB protein ve rEipB protein içeren nanopartiküllerin immünostimulan etkinliğinin ilk kez incelenmesi, PLGA nanopartiküllerinin ilk kez Bruselloz hastalığına karşı aşı geliştirilmesine yönelik çalışmalarda immün yanıtı indükleyici etmen olarak kullanılması, PLGA ile kontrollü salım esaslı kurulacak sistemin çok daha uzun süreli ve daha etkin bir immün yanıt oluşturmalarının beklenmesi de bu çalışmanın hedefleri arasındadır.

2.1 *Brucella abortus* Tarihçesi

Brucella abortus, sığırlardaki yavru atımının sebebi olarak 20. yüzyılın başında Banhard Bang tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra bu hastalık insanların enfekte koyun ve keçilerden kapıldığı *B. abortus* bakterisi ile yakından ilişkili olan *B. melitensis* bakterisinin sebep olduğu Malta Ateşi ile ilişkilendirilmiştir [24]. Banhard Bang *B. abortus*'u keşfetmeden önce İngiliz askerlerinin tedavi altına alındığı Malta'da geceleri sıklıkla 41 °C'ye kadar yükselen, gündüzleri normale dönen ateşin ön planda olduğu ölümcül vakalar görülmekteyken Malta'da görevli askeri hekim J. A. Marston da bu vakalar arasında yerini almıştır. J. A. Marston, haftalarca süren yüksek ateş, gastrointestinal rahatsızlıklar, kas ağrısı içeren şikayetlerini 1860 yılında bir makale olarak yayınlamıştır. Bu makale Malta Humması olarak kayıtlara geçen ilk vaka olmuştur. Akabinde Malta'da artmaya devam eden ölümcül vakalar sebebiyle David Bruce bölgeye gönderilmiş ve ölen hastaların karaciğer, böbrek ve dalaklarından "Micrococcus" adını verdiği patojeni saptayıp üretmeyi başarmıştır [25, 26]. 1897 yılında da Danimarkalı veteriner hekim Banhard Bang, *Basillus abortus* adını verdiği sığırlarda abortus ile ölüme sebep olan patojeni saptamış ve aglütinasyon testini de İngiliz kökenli patolog Wright yakın dönemde keşfetmiştir [26]. *B. abortus* sığırlarda yavru atımı, kısırılık gibi üremede problemlere sebep olduğundan ciddi ekonomik sıkıntılara da sebebiyet vermiştir [27]. Bu durumun ciddiyeti Latin Amerika'daki sığırlarda görülen Brusellozun ekonomiye verdiği sıkıntının senelik 600 milyon dolar olarak tahmin edilmesiyle vurgulanabilir [28].

2.2 *Brucella abortus* Morfolojisi



Şekil 2.1 *Brucella* bakterisinin mikroskop altındaki gram boyama görüntüsü [29]

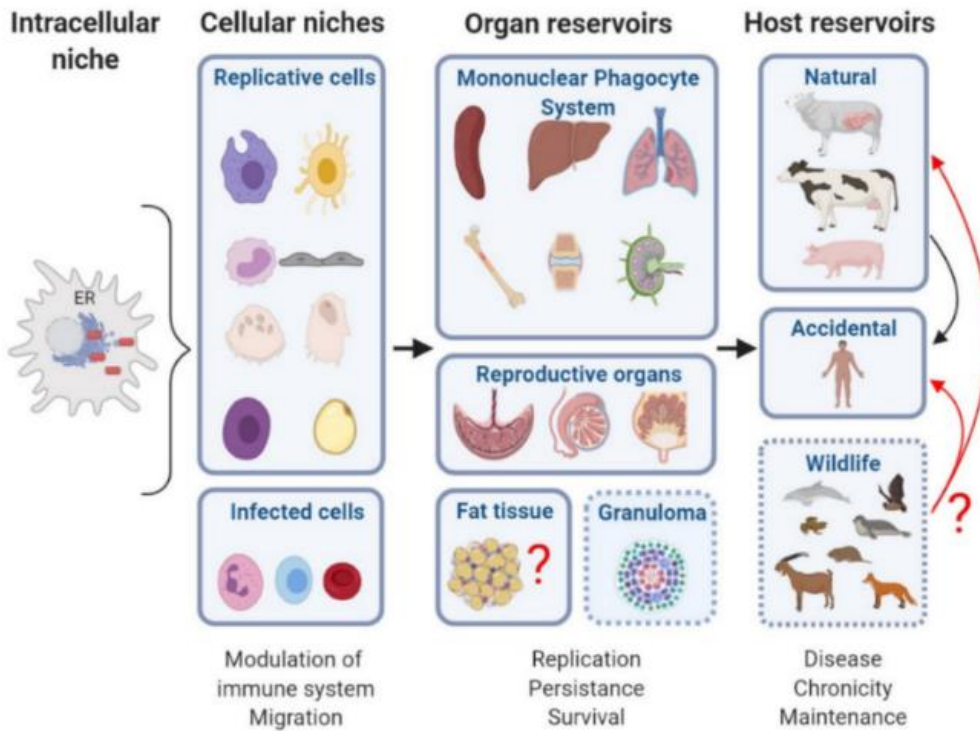
Brucella abortus uygun besiyerine ekildikten sonra kültürde görüntülenmesi ortalama iki gün içerisinde başlar. Kültürün negatif olarak değerlendirilebilmesi için 8-10 gün beklenmesi gerekir. Kolonilere yukarıdan bakıldığında nispeten eski koloniler koyu renkli gözüktürken, normal koloniler inci beyazı renginde bir görünüme sahiptirler [30]. 0,5-0,7 μm çapında, 0,6-1,5 μm uzunluğunda olan hareketsiz, sporsuz, küçük kokobasiller olan *B. abortus* bakterileri genel olarak tek tek konumlanırken nadiren kısa zincir oluşturdıkları da gözlemlenmektedir [3]. Gram negatif (Şekil 2.1), kapsülsüz bakterilerdir, gram boyamada pembe renkli görünürler ve düzensiz boyandıkları da olmaktadır. Kültürde en az 48 saatlik inkübasyon akabinde koloniler küçük, konveks, şebnem tanesi gibi ve nispeten sarı renkli, ışığı yansıtabilen S koloniler olarak gözlemlenmektedir [30, 31].

2.3 *Brucella abortus* Biyolojisi

Brucella mukozal epitelyal tabakayı hızlıca geçerek mukozal makrofajlar ve dentritik hücreler tarafından endositoza uğramaktadır [32, 33]. Bağışıklık sisteminin tepkilerinden başarılı bir şekilde kaçan *Brucella* farklı organlara yayılım gösterebilir. Bu durum hamile kadınlarda plasental trofoblastlara, fetal akciğere yayılarak ortaya çıkmaktadır [33, 34]. Epitelyal hücrelerle temastan önce yahut temas üzerine bağlanma molekülleri aktive olur ve *Brucella* bakterisi epitelyal hücre yüzey reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma sonucunda konak hücre zarının yapısını değiştirmek amacıyla hücre iskeletini etkileyen bir dizi sinyal molekülünü

içeren sinyaller zinciri indüklenmektedir [32, 33, 35]. Hücre içine giriş birkaç dakika içinde gerçekleşir ve *Brucella* 72 saate kadar hücre içindeki replikasyonunu sürdürür. Akabinde epitel boyunca harekete başlar ve bu hareketi mukozal epitel bariyeri bozarak gerçekleştirmektedir. Bu ilişki doğuştan gelen bağışıklık sisteminin zayıf bir proinflamatuvar etki ile ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Epitel kısma geçiş yaptıktan sonra makrofaj hücreleri tarafından *Brucella* fagosit edilmektedir ancak *Brucella* hücreleri bağışıklık sistemi tarafından yakalanmayı ertelemek için farklı reaksiyonlar gösterir. Bu reaksiyonlara patojenle ilişkili moleküler modellerini azaltması, değiştirmesi veya gizlemesi örnek olarak verilebilir [33, 36]. Ancak bazı Toll-like reseptörleri (TLR2, TLR4, TLR9) inflamatuvar genlerin ekspresyon kontrolünden sorumlu transkripsiyon faktörü NF- κ B aktivasyonundan sorumlu sınırlı hücre içi sinyal salımını başlatmaktadır [33, 37]. Enfeksiyon boyunca adaptasyon sürecinde hayatta kalan istilacı *Brucella*, adaptasyon dönemini atlattıktan sonra metabolik reaksiyonlarla bütünleşmiş genlerin ekspresyonunu yavaş yavaş tekrar gerçekleştirmektedir. Adaptasyon sürecine katılan erken transkripsiyon değişimleri boyunca *Brucella* kronik enfeksiyon gerçekleştirmek için oldukça önemli stratejiler sergiler. Bunların arasında enfekte mononükleer hücrenin apoptozunun engellenmesi, dentritik hücre olgunlaşmasının engellenmesi, antijen sunumunun azaltılması, naif T hücrelerinin aktivasyonunun azaltılması yer almaktadır [33, 38]. Makrofaj içi çevredeki varlığını kesinleştiren *Brucella*, hedeflediği hücre ve dokulara metastaz gösterebilmektedir. Bu sürecin nasıl gerçekleştiği henüz bütünüyle aydınlatılamamıştır fakat konu hakkında yürütülen çalışmalar mevcuttur [33, 39, 40].

2.4 *Brucella abortus* Patogenezi



Şekil 2.2 *Brucella* bakterisinin hücre içi nişleri ve rezervuarları [41]

Şekil 2.2’de hücre içi ortamdaki nişleri ve organ, memeli rezervuarları görülmekte olan *Brucella* türleri genel olarak intraselüler bakterilerdir ve monosit-makrofaj hücreleri içinde üreme gösterirler. Mikroorganizmanın inokulum büyüklüğü çok küçük olduğu için bulaş kolay gerçekleşmektedir. Bulaşmanın akabinde *B. abortus* basil bağırsak mukozasını geçerek öncelikle lenfatiklere, akabinde kana karışarak seyrederek. Kana karıştıktan sonra bakteriyemiye sebep olur. Brusellozda *Brucella*’nın makrofajların lizozomal enzimlerinden kendisini hücre içi ortamı değiştirerek koruduğu bilinmektedir fakat bunu nasıl gerçekleştirdiği henüz açıklanamamıştır [42]. *B. abortus* diğer *Brucella* türlerine nispeten daha az sıklıkta enfeksiyon vakalarının, fazlalıkla ise subklinik vakaların temelinde yer almaktadır [43]. *B. abortus* bir patojen olarak geliştikçe konakçısını istila etmek için virülans faktörler kazanmaktadır. Virülans faktörleri, konak hücre içinde parçalanmaktan korunmasına, konak hücreyi istilaya devam etmesine, hedeflediği nişe ulaşmasına, konak-patojen etkileşiminde önemli olan fagositoz, fagolizozom füzyonu, sitokin salgılanması ve apoptozu değiştirmesine olanak sağlamaktadır [44]. Hücre içine

girdiğinde erken fagozomların içine yerleşerek geç lizozomların, endozomlardan füzyonundan korunmuş olmaktadır [45, 46]. Bakterinin yüzeyindeki pürüzsüz, endotoksik olmayan lipopolisakkaritlerin enflamasyonda görevli olan sitokin salımlarını engellemesi, MHC sınıf II antijenlerin sunumunda değişikliğe sebep olması, en önemli mekanizmalardan birisi olan enfekte hücrenin apoptozunu engelleyerek istilaya devam etmesi bakterinin konak hücrede çoğalmasında ve yaşamını devam ettirmesinde büyük önem taşımaktadır [42]. Bu özellikleri, hastalığın patolojisine, klinik belirtilerine ve tedavisine yön vermektedir. Ayrıca *VirB* operonu, bakteride *Brucella* Tip IV Salgı Sistemi'ni kodlar. Bu sistem, konak hücre içinde *Brucella*'nın canlılığını sürdürmesini, çoğalmasını sağlar. Mevcut virülans faktörleri, hücre içi replikasyon mekanizması, sebep olduğu kronik enfeksiyon *B. abortus* bakterisinin tedavisini daha zor kılmaktadır [45, 46]. *Brucella* bakterisinde bağışıklık sisteminin oluşturduğu antikor yanıtı Ig antikorlarıyla kendisini gösterir. *Brucella* bakterisinin lipopolisakkaritlerine karşı Ig M antikoru enfeksiyonun ilk haftasında ortaya çıkarken, Ig G antikorları ise bulaş gerçekleşikten iki hafta sonra ortaya çıkar. Dördüncü haftada ise Ig G ve Ig M antikorları en yüksek seviyelerine çıkarken ve Ig A antikoru oluştuğunda kronik enfeksiyonun meydana geldiği anlaşılmaktadır [42].

2.5 *Brucella abortus* Virülans Faktörleri

2.5.1 Lipopolisakkaritler

Brucella bakterisinin esas virülans faktörü lipopolisakkaritlerdir (LPS). Lipit A, oligosakkarit kor, O,antijen içeren LPS gram negatif bakterilerde bulunmaktadır. Ancak *Brucella* bakterilerindeki LPS, *E. coli* gibi diğer gram negatif bakterilerden farklı ve klasik dışıdır. *E. coli* bakterisinden izole edilen LPS'ye göre *Brucella* bakterisindeki LPS daha az aktif, daha az toksiktir. Klasik LPS daha yüksek projenite gösterirken klasik olmayan LPS daha az projenite göstermektedir [47]. *B. abortus* bakterisinde bulunan, lipit A içeren LPS üç temel özelliğiyle diğer LPS türlerinden ayrılmaktadır;

- i) Ana element glukozamin yerine diaminglukozdur,
- ii) Daha uzun açıl grupları mevcuttur,
- iii) Lipit A, ester bağları yerine amid bağları ile kora bağlanmaktadır [48].

B. abortus gibi smooth koloni strainlerinde bulunan LPS (S-LPS) şunları içermektedir;

- i) Aminoglukozların içi çeşidini, yağ asitleri ve β -hidroksimiristik asitini içeren lipit A mevcuttur,
- ii) Kor, kinovazamin, mannoz, glukozdan oluşmaktadır,
- iii) O-zincirlerini 4-formamid-4,6-dideoksimannoz oluşturmaktadır.

B. ovis, *B. canis* gibi rough koloni strainlerinde bulunan LPS (R-LPS) S-LPS ile O-zincirlerinin azalmış olması yahut yok olması dışında benzer özellikler göstermektedir [49].

2.5.2 Tip IV Sekresyon Sistemi

Bakteriyel makromoleküllerin salgılanmasında rol almakta olan T4SS multiprotein kompleksidir. Bu sistem, 12 proteini (11 860 bp) kodlayan virB operonu ile karakterize edilir ve *Brucella spp*'de sergilenir. *Brucella*'nın bazı strainleri sadece endoplazmik retikulumda çoğalma yeteneğine sahiptir. VirB mutantları olan *Brucella* türleri ise ER'ye ulaşma noktasındaki yetersizlikleri sebebiyle ER içinde çoğalamamaktadırlar. Makrofajlarda ise *Brucella* bakterileri *Brucella* içeren vakuollerde (BCV) lokalize olmakta ve bu organel ER ile etkileşime geçmektedir. ER membranının kazanılması ile fonksiyonel bir VirB sekresyon sistemine sahip olunmasına bağlıdır [50].

2.5.3 Süperoksit Dismutaz ve Katalaz

Brucella bakterisinin bulunduğu makrofajlar reaktif oksijen ara maddeleri (ROI) üretmektedirler. Bu mekanizma bakterinin yok edilmesi için ilk adımdır ve hücre içi replikasyonunu da engellemektedir [50]. Reaktif oksijen ara maddelerinden olan O^{-2} , H_2O_2 , OH^- hücre için oldukça zararlıdır. Enzimlerin üretimi ise ana savunma mekanizmasıdır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz bu enzimlere örnek olarak verilebilir [51]. SOD O^{-2} 'nin H_2O_2 'ye dismutasyonu, O_2 'nin bir molekülden diğerine transferi için görevlidir ($2O^{-2}+2H^+ \rightarrow H_2O_2+O_2$) [52]. *B. abortus* gibi *B. melitensis*, *B. suis* de SOD'nin iki türüne sahiptir. Katalaz da hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamakla görevlidir. *B. abortus* katalaz üretimi H_2O_2 'nin artan dış seviyesi ile düzenlenir [53].

2.5.4 Siklik β -1-2-Glukanlar (C β G)

B. abortus C β G, makrofaj yüzeyindeki lipid salları üzerinde hareket ederek hücre içi ticareti etkiler. Bu glukanlar fagozom-lizozom füzyonunun kontrolüne katılmaktadırlar. Mutantlar fagolizozomlarda yok edilmekte ve çoğalma kabiliyetlerini kaybetmektedirler. Dahası, C β G ile muamele edilmiş olan mutantlar, vakuol olgunlaşmasını ve lizozom füzyonunu kontrol edebilir, böylece ER'ye ulaşabilir ve orada çoğalabilmektedirler [54].

2.5.5 Üreaz

Üreaz, üreyi amonyum ve karbonik asite parçalayarak pH artışına sebebiyet veren bir metaloenzimdir. Bu durum *Brucella* bakterisinin asidik ortamda hayatta kalımını sağlamaktadır. Bu enzim aynı zamanda ağız yoluyla alınmış olan bakteriyi sindirim sisteminden geçerken de muhafaza etmektedir. Aynı zamanda üreaz enzimi *Brucella* bakterilerinin *B. ovis* hariç hepsinde üretilmektedir [55].

2.5.6 Sitokrom Oksidaz

Sitokrom oksidaz bakterinin makrofaj içerisinde oksijen kullanımı sınırlıyken sağkalım oranını arttırmasıyla bilinmektedir. Genomda sitokrom oksidazı kodlayan iki adet operon vardır. Bunlardan sitokrom cbb3 oksidaz in vitro eksprese olmakta ve anoksik dokularda kolonizasyona yardım etmektedir. Sitokrom bd oksidaz ise hücre içi çoğalma esnasında eksprese edilmekte ve replikatif nişin ayarlanmasında görev almaktadır [56].

2.5.7 Alkil Hiperoksit Redüktaz (AhpC, AhpD)

Bu enzimler bakteriyi oksijen radikallerinden ve reaktif nitrojenden korumaktadır. AhpC mutantları peroksit öldürmeye daha duyarlı ve ani mutageze karşı hassasiyet sahibidir [50].

2.5.8 Nitrik Oksit Redüktaz (NorD)

Nitrik oksit redüktaz, bakterinin hücre içinde oksijen oksikliğinde nitratin dinitrojen gazına dönüştürülmesinden sorumludur. Enfekte makrofajlar nitrik oksit (NO) üretmektedir ve *Brucella* nitrik oksiti kendi menfaatleri için kullanabilmektedir [50].

2.5.9 *Brucella* Virölans Faktör A (BvfA)

BvfA ekspresyonu, makrofajlar tarafından fagozom asidifikasyonu boyunca indüklenmektedir. Bu proteinin fonksiyonu henüz tamamen tanımlanamamış olmasına rağmen hücre içi replikasyon nişinde yer aldığı düşünülmektedir [57].

2.5.10 Baz Onarım Mekanizması (BER)

DNA onarımında görev alan ekzonükleaz III, XthA geni tarafından kodlanmaktadır. İki farklı dizisi (xthA-1, xthA-2) *Brucella* genomunda yer almaktadır. XthA-a mutanlığı rekatif oksijen türlerine karşı yüksek duyarlılık göstermektedir. Sonuç itibarıyla bu enzim oksidatif redüksiyona karşı korumadan görevlidir [50].

2.5.11 EipB ve Omp Proteinleri

Brucella bakterilerinin memeli konakçılarda yaşamını sürdürebilmesi için stres faktörleri ile baş etmeyi, oksidatif saldırılara direnç göstermeyi, fagositik departmandaki pH ile mücadele etmeyi başarabilmesi gerekmektedir. Bu noktada bakteri hücre zarının moleküler parçaları önemli bir rol oynamaktadır. Zar bütünlüğü proteini A yani EipB proteini periplazmik bir proteindir. Bu periplazmik protein, hücre zarfı stres faktörlerine karşı direnç sağlamakta ve bir fare enfeksiyon modelinde *B. abortus* virölansını belirlemektedir. Karakterize edilmemiş DUF1849 gen ailesine mensuptur. *B. abortus* enfeksiyon biyolojisindeki Alfareobakteriyel genlerin korunmasının bilinmeyen fonksiyona ait rolünü değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, THP-1 makrofaj benzeri hücreleri, bir EipB silme suşu (Δ eipB) ve vahşi tip *B. abortus* ile ve genetik olarak tamamlanmış bir Δ eipB suşu ile enfekte edilmiştir [21]. Enfekte makrofajlar parçalanmış ve enfeksiyondan 1, 24 ve 48 saat sonra triptik soy agar plakalarında (TSA) koloni oluşturan birimler sayılmıştır. Enfeksiyondan 1, 24 veya 48 saat sonra suşlar arasında önemli bir fark gözlemlenmemiş, bu da EipB'nin in vitro giriş, replikasyon veya hücre içi hayatta kalma için gerekli olmadığını göstermiştir. Aynı çalışma EipB'nin bir BALB/c fare enfeksiyon modelindeki rolünü ayrıca değerlendirildiğinde Δ eipB ile enfekte olmuş farelerin, enfeksiyondan bir hafta sonra vahşi tip *B. abortus* suşu 2308 ile enfekte olmuş farelere kıyasla dalak ağırlığı veya bakteri yükü açısından anlamlı bir farkı

ölçülmemiştir. Bununla birlikte, enfeksiyondan 4 ve 8 hafta sonra, vahşi tip veya tamamlanmış eipB delesyon suşları ile enfekte edilen farelerde belirgin splenomegali ve yaklaşık 5×10^6 CFU/dalak bakteri yükü tespit edilmiştir. Buna karşılık, Δ eipB ile enfekte olmuş fareler, daha az bakteri ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/dalak) ile daha küçük dalaklara sahip olarak gözlemlenmiştir. Tüm bunlar neticesinde EipB'nin ilk dalak kolonizasyonu için gerekli olmadığı, ancak 8 haftalık bir periyot boyunca dalakta tam virülans ve kalıcılık için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır [21].

Brucella dış zar proteinleri (Omp proteinleri), *Brucella* enfeksiyonunun serolojik teşhisi için mükemmel adaylar ve Bruselloz'a karşı rekombinant alt ünite aşılar için potansiyel antijenlerdir [19]. Omp25, *Brucella* türlerinin başlıca Omp'lerinden biridir ve *Brucella*'nın virülansı ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Omp25 içermeyen *Brucella* türleri, farelerde vahşi tip suşlardan daha kısa bir süre hayatta kalır. Yapısal bir protein olarak Omp25, *Brucella*'nın çeşitli tiplerinde ve alt tiplerinde yüksek oranda korunmakta ve güçlü bir bağışıklık tepkisini indüklemektedir. Bu nedenle Bruselloz için yararlı bir tanısal hedef olabilir. Önceki bir çalışmada, Omp25'e karşı bir antikör, bir lateks pıhtılaşma testi yoluyla kaba *Brucella* izolatlarını tanımlamak için kullanıldı [58].

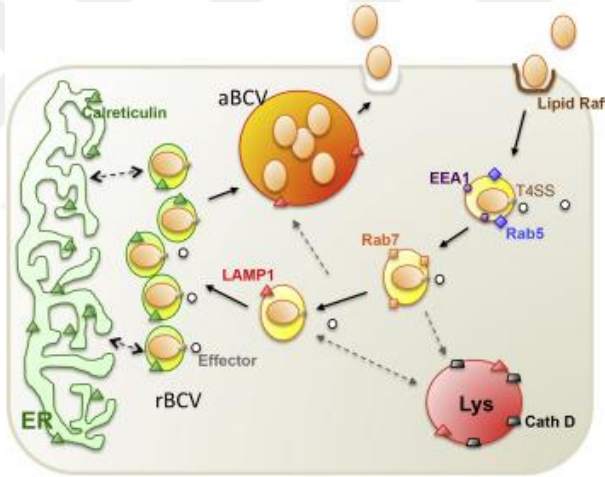
2.5.12 BvrR/BvrS Sistemi

Brucella genomu üzerine yapılan araştırmalarda iki adet açık okuma çerçevesi keşfedilmiştir: BvrR, BvrS. BvrR N-terminalinin fazlaca korunmuş olması ile yanıt düzenleyici proteinlere benzerlik göstermekte, C-terminali ise OmpR ailesinin dizisine yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Bu sebeple BvrR proteini OmpR ailesine dahil edilmektedir [59]. BvrS ise C-terminalinde yüksek oranda korunmuş dört bölge içermektedir; H, N, D/F ve G. Bu özellikleri BvrS proteinini histidin protein kinaz ailesinin sensör proteinlerinin homoloğu yapmaktadır. BvrS hücre membranında yer almaktayken pek çok genin ekspresyonunda rol alan BvrR/BvrS, *Brucella* virülans sistemi ile karakterizedir. Bu proteinler, membran proteinlerinin transkripsiyonunu etkilemektedir: Omp3bb (Omp22) ya da Omp3a (Omp25a). Membran proteinlerinin transkripsiyonunu etkilemeleri membran homeostazını fonksiyonel ve yapısal olarak etkilemektedir [59, 60]. BvrR/BvrR lipozom

füzyonunda, hücre içi etkileşimlerde de rol almakta ve BvrS proteini fosforilasyona, BvrR proteininin aktivasyonuna sebep olmaktadır. BvrR lipit A kodlayan genlerin transkripsiyonunu da aktive etmektedir. Sonuç olarak BvrS/BvrR mutantları katyonik peptitlere oldukça hassastır ve yüzey aktif maddeler için artan bir geçirgenlik sağlamaktadırlar [50]. Omp3a ve Omp3b'nin virülans üzerindeki etkisi ise henüz detaylı olarak açıklanamamaktadır [60]. Ancak BvrR/BvrS iki bileşenli sistemin virB gen ekspresyonunu vjbR transkripsiyonunun pozitif uyarılması ile düzenlediği bilinmektedir [59].

2.6 *Brucella abortus* Hücre İçi Etkileşimleri

Brucella, *Brucella* içeren vakuollerin hücre içi parçalanmasından lizozomal bölme ile füzyonu kısıtlayarak kaçış göstermektedir. VirB T4SS, hücre içi *Brucella* replikasyonunu düzenler ve bu sistemi barındırmayan *Brucella* bakterileri hücre içi replikasyondan, hücre içinde varlığını sürdürmesinden mahrum kalır [33].



Şekil 2.3 Makrofaj hücreleri içindeki etkileşimlerini gösteren *Brucella* modeli

Şekil 2.3'te gösterilmekte olduğu gibi smooth *Brucella* bakterisi plazma membranındaki lipit raftlar aracılığıyla makrofaj hücreleri içine alınır. *Brucella* içeren vakuol (BCV) olgunlaştıkça erken ve geç endozomlar için markerlar tarafından işaretlenir. Mor renkli olan erken EEA1 (Erken endozom antijeni), mavi renkli olan erken Rab5, turuncu renkli olan geç Rab7 endozomları (Şekil 2.3). BCV'nin hücre içi trafiği ve biyogenezi *Brucella* T4SS (Tip IV sekresyon sistemi) tarafından salgılanan bakteri efektör proteinleri (Şekil 2.3 beyaz halkalar) tarafından düzenlenir. Virülans organizmalar içeren BCV'ler LAMP-1 (Lizozom

ilişkili membran proteini) pozitif membranlarla geçici ilişki içinde olduğu gözlemlenmesine rağmen lizozomlar tarafından füzyona uğratılamaz (Şekil 2.3 cathepsin D, gri yamuk). Akabinde patojen ER için marker olan calreticulin içeren rBVC (Replikatif *Brucella* içeren vakuoller) içinde çoğalır (Şekil 2.3 yeşil üçgenler) ve enfeksiyondan sonraki 48-72 saat içerisinde patojen LAMP-1 pozitif olan aBVC'ler (otofajik *Brucella* içeren vakuoller) içinde görülmektedir. Nihayetinde patojen, hücreden litik olan ve olmayan mekanizmalar ile uzaklaştırılır [33].

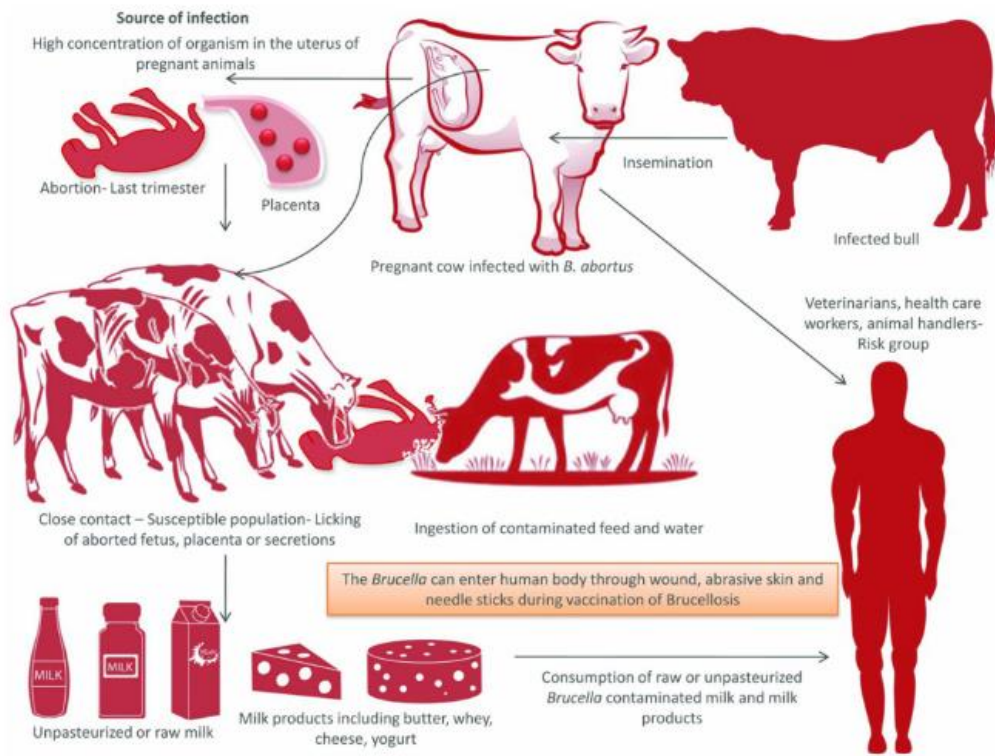
2.7 Bruselloz Epidemiyoloji ve Coğrafi Dağılımı

Brusellozun coğrafi dağılımı oldukça dinamik seyretmektedir ve bu durumun temelinde, Brusellozun yeni coğrafi bölgelerde görülmeye başlanması, eskiden Brusellozun görüldüğü bölgelerde yeniden görülmeye başlanması oluşturmaktadır. Bruselloz prevelansının devamlı olarak arttığı Orta Doğu ve Orta Asya ülkelerinde insan Brusellozunun yeni prevelans alanları ortaya çıkmıştır [61]. Kanada, Avustralya, Norveç, Kıbrıs, Finlandiya, Hollanda, Danimarka, İsviçre, Yeni Zelanda ve Birleşik Krallık hariç tüm dünyada yayılmış olan bir hastalıktır Bruselloz. Ancak, Akdeniz Avrupa, Güney ve Orta Amerika, Meksika, Afrika, Yakın Doğu ülkeleri, Orta Asya, Hindistan ve İtalya Brusellozun oldukça yüksek prevalansına sahip olduğu ülkelerdir [62]. Buna karşılık Bruselloz Batı Asya, Hindistan, Orta Doğu, Güney Avrupa, Güney Amerika ülkelerinde endemik olarak görülmektedir [63]. İran'da yapılan bir araştırmada *B. abortus* türlerinden biovar 3, en yaygın biovar olarak değerlendirilmiştir [64]. Endemik alanların belli bölgelerinde raporlanan düşüş prevalansın sebebi olarak yetersiz denetim düşünülmektedir. Afrika, Güney Amerika, Brezilya, Pakistan, İtalya ve Mısır'daki Brusellozun sebebi ise su mandalarının biovar 1 *B. abortus* bakterisidir. İtalya'nın güney bölgelerinde ise hem sığır hem de su mandalarının *B. abortus* ile enfekte olduğu analiz edilmiştir [65]. Mısır'da ise Bruselloz endemik bir problem olmaya devam ederken Kuveyt, Suudi Arabistan, İsrail'in örnek verilebildiği bazı ülkelerde Brusellozun sebebi olarak *B. melitensis* bakterisi de gösterilmektedir [66]. Görüldüğü üzere strainlerin yeni çeşitleri ortaya çıkmaya devam ettikçe, mevcut strainler farklı hayvanlara adaptasyonunu sürdürdükçe *B. abortus* bakterisinin sebep olduğu Bruselloz hastalığının prevalansını tahmin etmek güçleşecek ve

dinamik yapısını korumaya devam edecektir [3]. Hastalık insidansının gelişmekte olan ülkelerde en çok yükseldiği aralık ise hayvanların doğum oranının arttığı ilkbahar ve yaz ayları olarak belirtilmektedir [42].

2.8 Bruselloz Bulaş Yolları

Brucella bakterisinin yatay veya dikey yollarla bulaşı gerçekleşebilmektedir. Hamile hayvanların uterusunda daha fazla oranda görülmektedir. Hayvanlar, kontamine yem ve suları yutarak veya kürtaj yapılmış fetüslerle, fetal zarlarla ve uterustan akıntılarla temas ederek enfeksiyon kapmaktadırlar (Şekil 2.4). Anne hayvanın sütündeki bakteriler yenidoğana aktarılma riskine de sebep olmaktadır ve mikroorganizma özellikle soğuk ve nemli ortamlarda aylarca canlılığını koruyabilmektedir. Ancak hamile ineklerde abortus hamileliğin son üç ayında gerçekleşmektedir. Tam da bu noktada düşüğü gerçekleşmiş olan fetüs, plasental zarlar ve salgılar diğer hayvanlara bulaş riskini ortaya çıkarır. Muayene eden veteriner hekimler, sağlık çalışanları da risk grubunda yer almaktadırlar [3].



Şekil 2.4 *Brucella* bulaş yolları [3]

Çiğ et, pastörize edilmemiş süt, peynir, yağ gibi süt ürünlerinde de canlılığını koruyabilen *B. abortus* bakterisi bu besinler yoluyla da bulaşını gerçekleştirebilir. Aynı zaman da açık yaradan temas ve solunum yoluyla da Bruselloz hastalığı meydana gelebilir. Hayvanların toplu olarak aşılınması insanları da Bruselloz hastalığından muhafaza etmektedir [42].

2.9 *Brucella abortus* Kültür ve Üreme Özellikleri

Brucella abortus çubuk şekilli, hareketli olmayan, oksidaz pozitif, katalaz pozitif bir mikroorganizmadır. Diğer mikroorganizmalar gibi *B. abortus*'un da optimal büyüme koşulları vardır [67]. *Brucella* türleri genel olarak konakçı dışında üreme gösterememektedir ancak bakterinin üremesine elverişli ısı, nem, asidite koşulları sağlandığında uzun süre canlılığını sürdürebilmektedir. Mevcut koşullar sağlanmadığında *Brucella abortus* bakterisi güneş ışığı, pastörizasyon, kuru hava (pastör fırını) ve dezenfektanlara karşı oldukça hassastır. Bu hassaslık 60 °C sıcaklıkta 10 dakika içerisinde, 100 °C sıcaklıkta hızlıca ölümünün gözlenmesi ile daha net kanıtlanmıştır. Ancak bakterinin dirençli yönünün ortaya çıktığı koşullardan olan karanlık ve nemli ortamlarda 50 ile 70 arasında, su içeren ortamlarda 15 gün, süt içerisinde 1 ile 2 gün arasında, dondurucuda 3 ile 5 ay aralığında, kaynatılmadan gerçekleştirilen süt dondurma işleminde 1 ay canlılığını korumaktadır [67, 68]. Bahsedilen koşullar dışında bakterinin konakçı olarak yer aldığı organizmanın idrarında 30 gün süreyle, hayvanların atıklarında 75 gün süreyle, vajinal akıntılarda ise 200 gün süreyle sağ kalımını devam ettirdiği bilinmektedir. 56-61 °C sıcaklıkta gübre içinde yer alan bakteri 4 ile 5 saat aralığında canlılığını yitirmektedir. Kaynatma işlemi gerçekleştirilmeden kullanılan süt ile üretilmekte olan tuzsuz kremada 142 gün süreyle, %10 tuz içeren salamura peynir içerisinde 45 gün süreyle canlılığını koruduğu analiz edilmiştir. Etlerde ise durum şu şekilde seyretmektedir; kesimden sonra normal dinlendirme süresinde ette oluşan pH değişimi sebebiyle tahribat süresi başlayan bakteriye söz konusu değişiklik hızlıca etki eder. Dezenfektanlara karşı hassas olan *Brucella* yüzey dezenfeksiyonunda kullanılan %2 formol içeren veya %1 lizol içeren çözeltilerde 15 dakika içerisinde tahrip olmaktadır [68, 69].

Brucella türleri organizmadan izole edildiğinde genel kullanım besiyerlerinde üremesi sıkıntılı bir durumdur, yavaş bir üreme süreci gözlemlenir. Selektif besiyeri kullanımı organizmadan izolasyon aşamasında gerekli olabilmektedir. Besiyerlerinde kan ve serum kullanılması üreme hızını yükseltmektedir. *Brucella* agar, çikolara agar, serum dekstroza agar gibi kan ile zenginleştirilmiş besiyerleri, defibrine koyun kanı ilave edilmiş trypticase soy agar gibi besiyerleri *Brucella* kültüründe sıklıkla kullanılan besiyerlerindendir. İlk izolasyonun akabinde bakterinin pasajlarında üreme hızı oldukça iyi ilerlemektedir. İlk izolasyonda ise *Brucella abortus* %5-%10 CO₂ içeren ortama gereksinim duyar. *B. abortus* genel *Brucella* türleri içinde analiz edildiğinde uygun atmosfer şartlarında bile zor üreme gerçekleştirir. Ancak ilk izolasyondaki uygun atmosfer şartlarında bile gösterdiği yavaş üreme durumunu, ilk izolasyon atlatıldıktan sonraki süreçte normal atmosfer şartlarında bile hızla çoğalarak telafi eder [68, 70]. 37 °C ortam sıcaklığı üreme koşulları açısından optimal değerlendirilmekte olsa dahi 20-40 °C aralığındaki herhangi bir sıcaklıkta üreme gösterebilmektedirler. Uygun ortam pH değeri 6,6-7,4 değerleri aralığında analiz edilmektedir. Bakterinin uygun besiyerine ekiminin akabinde 48-72 saat içerisinde besiyeri üzerinde smooth koloni oluşumları görülebilmektedir. Hemolizsiz ve nispeten pigmentsiz/az pigmentli olan bu koloniler belli pasaj sayılarından sonra morfolojilerini kaybetmeye başlamakta ve *B. abortus* bakterisinin bazı kolonilerinde kahverengi-esmer renkli koloniler kendini göstermektedir [70]

2.10 Bruselloz Enfeksiyonu ve Tanı

2.10.1 Fizik Muayene Bulguları

Brucella tanısı konulmadan önce fiziksel muayenede saptanan belli başlı bulgular vardır. Bunlardan sıklıkla karşılaşılan ilk bulgu ondülan, yani dalgalı ateştir. Ondülan tarzda olmadan da ateşin görüldüğü vakalar mevcuttur [42]. Yerel ve vahşi hayvanların bakteri rezervuarı olarak yer aldığı Bruselloz hastalığında *Brucella* bakterisinin giriş yolu ne olursa olsun tüm vücuda yayılarak retiküloendotelial sistemin hücrelerinde hayatta kalmakta ve replikasyon nişleri oluşturmaktadır. Sistemik bir enfeksiyon oluşturması yahut tercih ettiği herhangi bir organda kalması hastalığın seyrini belirlemektedir [71]. Klinik bulguları hastalığın evresine (akut,

subakut, kronik), dahil olmuş olan organ ve sistemlere bağlıdır. Lokalize hastalığa bağlı komplikasyonlar arasında, özellikle periferik artrit, sakroiliit ve spondilit şeklinde osteoartiküler belirtiler en sık görülenlerdir [72]. Mide-bağırsak iletişim çizgisinde dikkat çeken diğer organ da karaciğerdir. Hepatik yangı, karaciğerde apse görülmekte ve kronik granülomatöz hepatit de Bruselloz hastalığında sık rastlanılan bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır [42]. Aktif Bruselloz vakasında bildirilen karaciğer tutulum sıklığı oldukça değişken olup, %5 ile %52 arasında seyretmektedir; bu hastalarda granülomlar, inflamatuvar infiltrasyonlar ve parankimal nekrozlar tanımlanmıştır [73]. Daha az sıklıkla Bruselloz hastalığına enfektif endokardit ve mikotik anevrizmalar gibi ciddi vasküler komplikasyonlar da eşlik edebilmektedir. Bruselloz vakalarının %1 ila %2'sinde endokardit görülmekteyken, Bruselloz hastalarında başlıca ölüm sebebini de endokardit oluşturmaktadır [71]. *Brusella* endokarditinde aort kapağı da dahil olmak üzere çoğunlukla birden fazla kalp kapağı tutulma gösterir. Eş zamanlı *Brusella* endokarditi olan veya olmayan hastalarda mikotik anevrizmalar bulunabilir ve abdominal aortu, serebral arterleri, superior mezenterik arteri vb. etkileyebilir. *Brucella* bakterisine bağlı bronşit, pnömoni gibi solunum yolu hastalıklarının da mikroorganizmanın solunması sebebiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir [74-76]. Göz bulguları içinde ise üveit, anterior koroidit, retina kanaması, papilledöm saptanmıştır [77]. Görüldüğü üzere, *Brucella* sadece sistematik, nispeten hafif klinik belirtiler üretebilmekte ayrıca belirli bir organı veya sistemi etkileyerek ciddi komplikasyonlara da neden olabilmektedir. Tüm bu lokalize hastalık formlarının ortak bir özelliği, lezyonların inflamatuvar doğası ve doku hasarında inflamasyonun yer almasıdır [78]

2.10.2 Laboratuvar Analizleri

Bruselloz vakalarında yapılan tam kan sayım analizlerinde anemi, lökopeni, trombositeni, lökositoz, karaciğer enzim yüksekliğine rastlanmaktadır. Kan kültürü duyarlılığı ateşi olan hastalarda kronik süreçte ilerleyen hastalara nispeten daha yüksektir ancak kemik iliği kültürü kan kültürüne göre daha çabuk sonuç vermektedir. Aynı zamanda antibiyotik almış hastalarda, Bruselloz tedavisi antibiyotik ile yapılmaktadır, kan kültürüne göre kemik iliği kültürünün daha duyarlı olduğu da bilinmektedir. Serolojik testler, kronik hastalarda düşük

duyarlılık göstermelerine rağmen kolaylık ve hızlı sonuç vermesi açısından Bruselloz tanısında yararlı yöntemler olarak değerlendirilmektedir. Ancak yalnızca serolojik testler ile tanı konulması yerine kültür gibi diğer metotlarla da doğrulanması gerekmektedir [74]. Bu serolojik testlerden *Brucella abortus* enfeksiyonunun tanısında kullanılan Rose Bengale testi, Rose Bengale boyası ile *B. abortus* antijenlerinin renklendirilmesi ve serumdaki antikorlarla lamda aglütinasyon reaksiyonu gerçekleştirilmesidir. Hastalığın evresi, durumu bu test sonucuna etki etmemektedir çünkü testin duyarlılığı yüksektir. Fakat buna rağmen pozitif sonuçların daha duyarlı başka tetkiklerle doğrulanması gerekmektedir [79]. *Brucella* tanısı konulurken en sık kullanılan yöntem serum aglütinasyon (Wright) testidir. Klinik bulguları Bruselloz ile ilişkilendirilen vakalarda 1:160'lık titreler Bruselloz pozitif olarak değerlendirilir. Endemik bölgelerde bu değer 1:320'ye yükseltilmektedir. Testin erken devrelerinde verilen negatif sonuçların doğruluğu şüpheli olduğundan hastalığın akut döneminde serum aglütinasyon testi yaptırmak gerekmektedir. Akut döneminde yapılan testle IgG, IgM, IgA aglütininlerinin toplam miktarı ölçülmektedir. *Brucella* bakterisinin esas antijeni olan düz lipopolisakkarite karşı geliştirilen antikorların saptandığı bu testte antikorların varlığı iyileşmeden sonra da korunacağı için Bruselloz tanısında bu testin kullanılması tartışmalı bir konudur. ELISA, Coombs testi, kompleman fiksasyon testi, mikroaglütinasyon testi, "immunocapture" testi, floresans polarizasyon tetkiki de Bruselloz tanısında denenmiş olan laboratuvar analiz yöntemleridir. Bir diğer metot olan PCR (Polimerase Chain Reaction) yöntemi de hızlı sonuç alınan, her dokudan veya sıvıdan elde edilebilen, tür ve biyotip ayrımının yapılabildiği önemli bir yöntemdir [80, 81]. Yalnızca belli bölgelerde tutulum gerçekleşmiş olan hastalarda ise manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi gibi görüntüleme metotları yararlı bulunmaktadır [82].

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'nın yönlendirmelerinde ise Bruselloz tanısı şu şekilde konulmalıdır:

Hayvancılıkla uğraş halinde olan, mesleki sebeplerden temas eden, enfekte hayvana ait ürünleri tüketme öyküsü ile akut veya değişken ateş, yorgunluk, halsizlik, iştah kaybı, kilo kaybı, baş ağrısı, gece terlemeleri, kas ve eklem ağrıları ile başvuran hastalarda karakterizedir.

Laboratuvar Kriterleri:

- Serum örneklerinden Rose Bengale testi (Destekleyici)
- Klinik örneklerden *Brucella* bakterisinin izolasyonu, daha önce tedavi uygulanmamış olguda tek serum örneğinde serum aglütinasyon testinden antikor titresinin $\geq 1:160$ olması, belli aralıkla alınan iki serum örneğinde *Brucella* serum aglütinasyon titresinin ≥ 4 kat artış göstermesi. (Doğrulayıcı)

Vaka Sınıflandırması:

- Bruselloz hastalığının klinik tanımlamasına uygun olan ve destekleyici laboratuvar kriteri pozitif olan vaka (Olası vaka)
- Bruselloz hastalığının klinik tanımlamasına uygun olan ve doğrulayıcı laboratuvar kriterinden minimum bir tanesi pozitif olan vaka (Kesin vaka)

2.11 Bruselloz Tedavisi

Bruselloz hastalığının tedavisinde hastalığı tedavi olmadan atlatmakta olanlar dahil bütün hastalara antibiyotik verilmesi gerekmektedir. Buradaki asıl amaç, *Brucella* bakterisine karşı etkinliği kanıtlanmış, en gözde antibiyotik olan tetrasiklinin tedavi sürecinde kullanılmış olmasıdır [42, 83]. Tetrasiklin antibiyotiklerine ekstra olarak ikinci bir antibiyotik de takviye olarak verilmektedir. Bu takviyedeki sebep ise yalnızca tetrasiklin kullanıldığı durumlarda rölaps gözlemlenmesidir. İkinci bir antibiyotik olarak kinolonlar, trimetoprin/sulfametoksazol önerilmektedir. Bu antibiyotikler de ikinci bir ilaçla kullanılmaktadır. Tedavi süreci, vaka analizinde komplikasyonsuz, komplikasyonlu, çocuk, erişkin, gebe gibi durumlar göz önüne alınarak yürütülmektedir.

2.11.1 Antibiyotik Tedavisi

- ✓ Herhangi bir komplikasyon gözlemlenmeyen sekiz yaşında ve üzeri vakalarda Dünya Sağlık Örgütü;
- Altı hafta süreyle 12 saat aralıklı 100 mg oral doksisisiklin ve başlangıçtaki iki-üç hafta süreyle günde bir doz 1 g kas içine streptomisin
- ✓ Ağır olmayan enfeksiyonlarda;

-Altı hafta süreyle her gün bir doz 200 mg oral doksisisiklin ve her gün bir doz 600-900 mg oral rifampin önermektedir.

✓ Herhangi bir komplikasyon içermeyen sekiz yaşında ve üzeri vakalarda ise tedavi şöyle seyretmektedir;

-Altı hafta süreyle 12 saat aralıklı 100 mg oral doksisisiklin ve başlangıçtaki 7-10 gün süresince her gün bir doz 5 mg/kg kas içi veya damar yoluyla gentamisin

-Altı hafta süreyle her gün 2 g oral tetrasiklin ve başlangıçtaki iki-üç hafta boyunca her gün bir doz 1 g kas içine streptomisin

-Yahut kinolon içeren birleşik tedavi (30 gün süreyle ofloksasin/siprofloksasin + rifampin) doksisisiklin ve rifampin içeren tedavinin yerine önerilmektedir.

✓ Sekiz yaşın altındaki vakalarda ise optimal bir uygulama rejimi henüz belirlenmemiş olmasına rağmen yine antibiyotik kombinasyonları ile süreç ilerletilmektedir.

Erişkin bireylerde doksisisiklin ve streptomisin uygulamasının doksisisiklin ve rifampin içeren uygulamaya göre daha fazla etkinlik gösterdiği, rölaps oluşumuna daha az sebebiyet verdiği, yine erişkin bireylerde doksisisiklin ve gentamisin içeren tedavi yolunun 45 gün süreyle verilmesinin aynı tedavinin 30 gün süreyle verilmesine göre sebebiyet verdiği rölaps oranının daha az olduğu, tedavinin uygulandığı sürenin uzamasının yan etki sıklığında bir artışa sebebiyet vermediği, tetrasiklin ve streptomisin içeren uygulamanın tetrasiklin ve rifampin içeren uygulamadan daha etkili olduğu analiz edilmiştir [42, 84-86].

Gebe hastalarda da ideal bir tedavi uygulama rejimi henüz belirlenmemiştir. Aynı ayrı trimetoprin/sulfametoksazol, rifampin, trimetoprin/sulfametoksazol ve rifampin tedavileri uygulanmaktadır. Bruselloz hastalığına yakalanmış gebelerde hastalığın tedavi edilmesi durumunda %90 oranında bebeklerin sağlıklı olarak doğumunun gerçekleştiği ve abortusun engellendiği analiz edilmektedir. Ancak elbette bahsi geçen antibiyotiklerin yan etkileri de göz ardı edilmemelidir [87, 88]. Unutulmamalıdır ki tedavi edilmeyen *Brucella* enfeksiyonları kronikleşebilmektedir [42].

2.11.2 Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları

Tetrasiklinler, pozitif yüklü katyon (muhtemelen magnezyum)-tetrasiklin koordinasyon kompleksleri olarak OmpF ve OmpC porin kanallarından gram-negatif enterik bakterilerin dış zarını geçmektedir [89, 90]. Katyonik metal iyon-antibiyotik kompleksi, dış zar boyunca Donnan Potansiyeli tarafından çekilmekte ve bu da metal iyon-tetrasiklin kompleksinin, lipit çift tabakasından yayılabilen zayıf lipofilik bir molekül olan yüksüz tetrasiklini serbest bırakmak için muhtemelen ayrıştığı periplazmada birikmeye yol açmaktadır. Benzer şekilde, elektronötral, lipofilik formun, gram-pozitif bakterilerin sitoplazmik zarı boyunca aktarılan türler olduğu varsayılmaktadır. Tetrasiklinlerin sitoplazmik zardan alımı enerjiye bağımlıdır ve proton hareket ettirici kuvvetin ΔpH bileşeni tarafından yürütülmektedir [90, 91]. Sitoplazma içinde, dahili pH ve iki değerlikli metal iyonu konsantrasyonları hücre dışındakilerden daha yüksek olduğundan tetrasiklin moleküllerinin şelatlı hale gelmesi muhtemeldir [90]. Aslında, ribozoma bağlanan aktif ilaç türlerinin bir magnezyum-tetrasiklin kompleksi olması muhtemeldir [89, 92]. Tetrasiklinlerin ribozomla ilişkisi geri dönüşümlüdür ve bu antibiyotiklerin bakteriyostatik etkilerinin açıklanmasını sağlamaktadır [89].

Kinolon antibiyotikler, iki temel tip II topoizomerazi, DNA girazı ve topoizomerazi IV'ü (Topo IV) hedefleyerek DNA sentezini inhibe etmektedir. Her iki hedef de bir çift sarmallı DNA molekülünün diğerinden geçmesine izin vermekte, bunu orijinal sarmalın yeniden ligasyonu takip etmekte, böylece her enzimatik adımda DNA'nın bağlanma sayısını iki değiştirmektedir. Her iki enzim de yapılarında ve fonksiyonlarında yüksek derecede benzerlik gösterse de, DNA replikasyonu sırasındaki spesifik fonksiyonları farklıdır [93]. Hem DNA girazın hem de Topo IV'ün ana fizyolojik rolü, DNA replikasyonunu takiben yavru replikonların dekatasyonuna ek olarak DNA ve Topo IV'ün replikasyonu ve transkripsiyonudur. Negatif süper sarmal alanlarda organize olduğu öne sürüldüğü için DNA girazı, kromozomun organizasyonunda da rol oynayabilmektedir [94]. Kinolon inhibisyonunun mekanizması, topoizomerazi enzimi ve DNA ile üçlü bir bölünme kompleksinin oluşumu yoluyla gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, bu ilaçların etki şeklinin moleküler detayları belirsizliğini korumaktadır [95].

Sülfametoksazol, diğer sülfonamidler gibi, folik asit öncülünün üretiminde yer alan bakteriyel bir enzim olan dihidropteroat sentazın yarışmalı bir inhibitörüdür. Amerika Birleşik Devletleri'nde sülfametoksazol yalnızca, folik asit üretiminde yer alan bir aşağı akış enzimi olan dihidrofolat redüktazı inhibe eden bir antibiyotik olan trimetoprim ile kombinasyon halinde mevcuttur. Trimetoprim, sülfametoksazolden 20-100 kat daha güçlüdür ve bu nedenle farmakodinamik hedeflere ulaşmak ve etkinliği en üst düzeye çıkarmak için sülfametoksazol konsantrasyonları, trimetoprim konsantrasyonunun 20 katı olmalıdır [96]. Sülfametoksazol, doğrudan mikrobiyal organizmalar, örneğin bakteriler içindeki folatın sentezi üzerinde çalışan bir sülfonamiddir (antimikrobiyal ilaç sınıfı). Sülfametoksazol bunu dihidrofolatın sentezi sırasında dihidropteroat sentaz enziminin inhibisyonu yoluyla doğrudan bir p-aminobenzoik asit (PABA) rakibi olarak gerçekleştirmektedir. Trimetoprim, dihidrofolat redüktaz enziminin doğrudan bir rakibi olup, bunun inhibisyonu ile sonuçlanmakta, bu da tetrahidrofolatın aktif folat formuna üretimini durdurmaktadır. Bu iki ajanın kombinasyonu, sinerjistik bir anti-folat etkisi yaratmayı amaçlamaktayken; tetrahidrofolat, DNA ve protein üretimi için gerekli olan pürinlerin sentezlenmesi için gerekli bir bileşendir. Bu ilaçlar tek başlarına kullanıldıklarında sadece bakteriyostatik etki göstermektedirler [96, 97]. Sülfametoksazol, CYP450 sistemi tarafından hepatik olarak metabolize edilmekte olan bir CYP2C9 inhibitörüdür. Yarılanma ömrü 6-12 saat olup, böbrek yetmezliğinde 20-50 saate çıkmaktadır. Trimetoprim, 8 ila 10 saatlik bir yarı ömre sahipken karaciğerde minimum düzeyde metabolize edilip esas olarak değişmeden, esasen idrarla atılmaktadır [97].

2.12 Bruselloz ve Aşılar

Bugün dünya çapında *Brucella* bakterisine karşı kullanılmakta olan onaylı üç aşı vardır. Bu aşılarından ilki S19 aşısıdır. S19 aşısı sığırlarda Bruselloz'a karşı koruma sağlanması amacıyla 1923'te keşfedilen mutantından geliştirilmiştir. S19 aşısı *Brucella* aşıları arasında altın standart olarak yer almaktadır ve bugüne kadar elde edilmiş olan en etkili aşıdır. Bu aşı, *Brucella abortus* bakterisine karşı direnci arttırmakta olsa dahi yaklaşık %70 oranında bir verimle etki etmektedir. Dişi sığırlar aşılama yapılırken düşük yapma riski azaltılmış ve bakterinin süte geçme ihtimali de düşürülmüş olmaktadır [98]. S19'un önemli bir dezavantajı, yaygın

serolojik teşhis testleri kullanılarak aşılanmış ve doğal olarak enfekte olmuş hayvanlar arasında ayırım yapmayı zorlaştıran smooth fenotipidir. Hamile sığırlarda kullanıldığında düşüklere neden olabileceği ve insanlar için tamamen öldürücü olduğu için güvenlik de bu noktada başka bir endişe yaratmaktadır [15].

Brucella RB51 aşısı, *B. abortus* 2308'in (USDA yükleme suşu) rifampin ve penisilin içeren besiyerlerinde tekrarlanan in vitro pasajlarından sonra seçilen spontan bir rough mutanttır. O-LPS'nin olmaması, aşılanmış sığırların geleneksel test yöntemleri kullanılarak pozitif bir serolojik yanıt üretemeyeceği anlamına gelir; bu nedenle, RB51'in kullanılması, aşılanmış hayvanların doğal olarak enfekte olanlardan ayırt edilmesini sağlamaktadır. Sığırlara RB51 aşılması, *Brucella* kaynaklı düşük veya fetal enfeksiyonu önlemede etkilidir ve S19 ile karşılaştırıldığında nispeten güvenlidir. Aşının etkinliği, S19 ile aşılanmış sığırlarinkine benzemektedir. *Brucella* RB51'in önemli bir dezavantajı vardır, sadece insanlar için öldürücü değildir, aynı zamanda Bruselloz tedavisinde kullanılan en güçlü ve etkili antibiyotiklerden biri olan rifampine karşı dirençlidir [99, 100].

Rev1 aşısı ise koyun ve keçilerde görülmekte olan Bruselloz hastalığına sebep olan *B. melitensis* bakterisine karşı kullanılmaktadır. Diğer Bruselloz aşıları gibi insanlar için ölümcül olması sebebiyle inhalasyon yoluyla bulaştan sakınılması önem taşımaktadır [99].

Mevcut onaylı aşılardan yanı sıra, S19 aşısının belli genlerle modifiye edilmiş hali de aşının tanımlanmasında kullanılmak için çalışılmıştır. S19 aşısının altın standart olarak değerlendirildiği düşünüldüğünde aşının uygulandığı hayvanlarla enfekte hayvanların ayırt edilememesi büyük problem oluşturmaktadır. Bu noktada subunit, alt ünite aşılardan hayvanların immün sisteminin indüklenmesinde antijenlerin yahut saf DNA'nın kullanılmasını mümkün kılmaktadır [15]. Subunit aşılardan herhangi bir enfeksiyona sebep olmaması, farklı reaksiyonların ortaya çıkmasına zemin hazırlamaması subunit aşılardan üzerindeki çalışmaları da yoğunlaştırmaktadır. Ancak subunit aşılardan S19 aşısı kadar immün sistemi tetiklememesi korumanın sağlanması için aşılardan birden fazla doz halinde uygulanması gereksinimini doğurmaktadır [99].

Bugüne kadar Bruselloz hastalığına karşı geliştirilmeye çalışılan ve geliştirilmiş olan aşılarından koruma etkinliğini en yüksek düzeyde sağlayan, abortusa ve enfeksiyona karşı en yüksek düzeyde direnç gösteren aşılar hala canlı aşılardır. Yeni canlı *Brucella* aşılarının geliştirilmesinde hem konakçı hayvan hem de aşırı uygulayan insanlar için güvenlik konularının dikkate alınması gerekmektedir. Canlı bir aşı geliştirirken dikkat edilmesi gereken nokta, uygun bir adaptif bağışıklık tepkisini tetiklemek için konakçıda yeterince kalıcı olabilen ve aynı zamanda onu güvenli hale getirmek için azaltılmış virülans sergileyen bir suş oluşturmaktır. Diğer bir husus, *Brucella* LPS'nin çok immünojenik olmasıdır ve tutulmasının, koruyucu bağışıklığa katkıda bulunmak için önemli olduğuna inanılmaktadır [15, 99, 101].

2.13 Poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA)

Fizyolojik sistemde ilaçların hedeflenen bölgeye ulaştırılması için geliştirilen yöntemlerden son çalışmalarda dikkat çekenlerden bir tanesi de nanotaşıyıcı sistemlerdir. Bu nanotaşıyıcı sistemlerden polimerik olanlar ise FDA onaylı olup biyoyumlu ve biyozunur yapıdadırlar. Kontrollü olarak salım yapmaları, hedeflenen bölgeye ilaç ulaşımını kolaylaştırmaları ile dikkat çeken bu polimerik nanotaşıyıcı sistemlerden PLGA biyoyumlu, biyobozunur ve FDA onaylı bir polimerdir. Cerrahi doku greftleme ile bağ rekonstrüksiyonu gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. PLGA polimerinin söz konusu biyoyumluluğunun yanı sıra mükemmel bozunma kinetiği de dikkat çekmektedir [102]. Üretim metoduna göre PLGA nanopartiküllerinin boyutu farklılık gösterebilmektedir. Antijenik özellik gösterebilmesinin yanında makrofajlar ve dentritik hücrelere antijen sunucu olarak yer aldığı da yapılan çalışmalarla gösterilmektedir [103]. *B. abortus* bakterisinin antijenik proteinlerinin PLGA polimeri ile kullanıldığı başka çalışmalar da literatürde mevcuttur ve elde edilen sonuçlardan antijenlerin PLGA nanopartiküllerine yüklenmesinin olumlu sonuçlandığı araştırmalar da olmaktadır [103]. Kanseri tedavisine yönelik çalışmalarda da kanser ilaçlarının PLGA nanopartikülüne yüklendiği ve ilaçların tek başına kullanıldığında gösterdiğinden daha fazla etkinlik sergilediği bilinmektedir [102].

3.1 Materyal

3.1.1 Ekipman

- Hava akımlı kabinler (Thermo Scientific Hera safe, Faster BH-EN 2006)
- Ters mikroskop (Olympus CKX41)
- Işık Mikroskopları (Olympus ve Soif / BX51 ve BA2303)
- Öze (Isolab)
- Lam (Isolab)
- Lamel (Isolab)
- Bek alevi (Isolab)
- Oksidaz strip (Oxoid)
- Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF)
- Ultrasantrifüj (Beckman / Optima L100 XP)
- Karbondioksitli inkübatör (New Brunswick scientific CO-150 37 °C)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR3000)
- Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
- Pastör fırını (Memmert)
- Buz üretme makinesi (Scotsman AF100)
- Vortex (LMS (laboratuvarı medical supplies) VTX-3000L)
- Su banyosu (GFL (gessellschaft für labortechnik) mbH, Kerman)
- Pipet uçları (1-10, 20-200, 100-1000 µl'lik tek kullanımlık, AxyGen)
- UV-spektrofotometre (Jasco V-530)
- -197 °C azot tankı ve azot taşıma tankları (DMC air liquid systems)
- Otoklav (Kerman, HIRAYAMA)
- ELISA cihazı (Thermo)
- ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrometre) (Thermo)
- Saf su ve ultra saf su sistemleri (GFL2104)
- Mikropipetler (10, 100 ve 1000 µl'lik, Thermo, Pippetman)
- Enjektörler 1, 5, 10 ve 50 cc'lik (Ayset)

- Enjektörler 0,5 ml (BD Micro Fine Plus)
- Dondurucular (Beko (+4, -20°C), Arçelik (+4, -20°C), GFL(-40°C))
- Santrifüj tüpleri 15 ve 50 mL (Eppendorf, IsoLAB)
- ELISA 96 kuyulu plakları (Nest)
- Hücre kültürü plakları (Nest)
- Kriyotüpler (TPP)
- Hücre kültür flaskları 25 ve 75 cm² (TPP, Corning)
- Serolojik pipet tabancası (Thermo)
- Serolojik pipetler 1, 5, 10 ml (Blau Brand Germany)
- Steril pastör pipeti 3 ml (LP ITALIANA SPA)
- Otoklavlanabilir cam şişeler 50-1000ml'lik (ISOLAB, SCHOTT)
- Thoma lamı hücre sayımı için (Menzelsuperior)
- Şırınga filtreleri 0,22 µm ve 0,45 µm'lik (MILLIPORE, TPP, Sartorius)
- Sonikasyon cihazı (Bandelin Sonoplus GM2200)
- pH-metre (HANNA instruments)
- Makas, diseksiyon seti (Müller)
- Süzgeç (BD Falkon)
- Bisturi (Beybi)
- BD GasPak EZ Pouch Systems (Celscientific)
- IFN-γ ELISA Kit (ELK Biotechnology, Wuhan, P.R.C)
- IL-12 ELISA Kit (ELK Biotechnology, Wuhan, P.R.C)
- IL-10 ELISA Kit (ELK Biotechnology, Wuhan, P.R.C)
- IL-4 ELISA Kit (ELK Biotechnology, Wuhan, P.R.C)
- TNF-α ELISA Kit (ELK Biotechnology, Wuhan, P.R.C)

3.1.2 Kimyasallar

- Anti-fare IgG konjugatı (Sigma)
- Urea agar base (Sigma)
- Tryptic soy broth, TSB (Sigma)
- Kristal viyole (Merck)
- Bazik fuksin (Merck)
- Kanlı agar (Sigma)
- LPS, *E. coli* (Merck)

- Tripan mavisi (Biological Industry)
- Yağsız süt tozu (AppliChem)
- Amonyum okzalat, $C_2H_8N_2O_4$ (Merck)
- Sodyum klorür, NaCl (Sigma)
- Hidrojen peroksit, H_2O_2 , (Sigma)
- Sodyum karbonat, Na_2CO_3 (Sigma)
- Sodyum bikarbonat, $NaHCO_3$ (Merck)
- Glisin, (Fluka)
- Magnezyum klorür, $MgCl_2$ (Fluka)
- Çinko Klorür, $ZnCl_2$ (Fluka)
- Sodyum azid, NaN_3 (Sigma)
- İyod, I_2 (Sigma)
- Potasyum iyodür, KI (Sigma)
- Monopotasyum fosfat, KH_2PO_4 (Sigma)
- Disodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4 (Merck)
- KCl (Sigma)
- EDTA (AppliChem)
- N-(1-Naftil)Etilendiamin (Sigma)
- Sülfanilamid (Sigma)
- MTT (3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide) (Sigma)
- Sodyum nitrit ($NaNO_2$)
- Etanol (Merck)
- Triton (Sigma)
- Tween-20 (MP Biomedicals LLC)
- Paranitrofenil fosfat (Sigma)
- RPMI-1640 (Fenol redli ve fenol redsiz) besiyerleri (GIBCO Invitrogen)
- DMEM High (Fenol redli ve fenol redsiz) besiyerleri (GIBCO Invitrogen)
- FBS-fetal bovine serum (GIBCO Invitrogen)
- DMSO (AppliChem)
- DMSO (Sigma, Hibri-Max)
- Tripsin (Biosera)
- Penisilin/Streptomisin (Sigma)

3.1.3 Deneylerde Kullanılan Tampon, Besiyerleri ve Kimyasalların Hazırlanışı

Tripsin Solüsyonu

0,25% tripsin solüsyonu hazırlamak için 2,5 gr Tripsin ve 0,2 gr EDTA tartılıp 1 ml'e tamamlanarak manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. -20 °C'de muhafaza edildi [104].

Tripan Mavisi Solüsyonu

Hücrelerin canlılık tayini için %10 tripan mavisi boya distile su ile hazırlandı [104].

MTT Solüsyonu

MTT tuzu 10 mg/ml PBS içerisinde hazırlandı. 0,22 µl'lik filtreden geçirildi ve -20 °C'de muhafaza edildi [104].

Dondurma Solüsyonu

Dondurma solüsyonu %90 FBS ve %10 DMSO olacak şekilde hazırlandı. -20 °C'de muhafaza edildi [104].

Hücre Kültürü PBS Tamponu

8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 1,44 gr Na₂HPO₄ ve 0,24 gr KH₂PO₄ 1 litrelik cam şişeye koyuldu. Üzerine 1 litre distile su eklendi. 121°C'de 20 dakika otoklavlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi [105].

ELISA PBS Tamponu

8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 1,8 g Na₂HPO₄.2H₂O ve 2 g KCl tartıldı ve 1 litrelik cam şişeye koyuldu. Üzerine 1 litre distile su eklendi. 121°C'de 20 dakika otoklavlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi [104].

PBS-Tween 20 Tamponu (PBST)

Hazırlanan fosfat tamponuna (PBS) %0,05 (hacim/hacim) tween-20 eklendi. 1 litre hazırlanan PBS'e 500 µl Tween-20 eklendi [104].

Kaplama Tamponu (pH; 9,6)

1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃ ve 0,2 g NaN₃ 1 litrelik şişelere koyuldu. Distile su eklenerek 1lt'ye tamamlandı [104].

Bloklama Çözeltisi

100 ml kaplama tamponuna %2 (ağırlık/hacim) yağsız süt tozu eklendi [104].

PBS/Tween20/süt tozu (PBSTM)

PBS/Tween20 (PBST) çözeltisine %2 (ağırlık/hacim) yağsız süt tozu eklendi [104].

Substrat Tamponu (pH:10,4)

0,02 g $ZnCl_2$, 0,04 g $MgCl_2$ ve 1,5 g glisin tartılarak şişeye koyuldu. Distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. +4 °C de 1 ay kadar saklanabilir [104].

Substrat Çözeltisi

25 ml substrat tamponuna 25 mg paranitrofenil fosfat eklenerek hazırlandı [104].

Griess Reaktifi

Griess reaktifinin hazırlanması için 20 ml distile suya 2,5 ml fosforik asit eklendi. Çözeltiye 0,1 g N-(1-Naftil)Etilendiamin ve 1 g Sülfanilamid eklendi ve karıştırıcıda karıştırıldı. Ardından çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlandı [105].

NO Standartları

0,345 g sodyum nitrit (500 μ M) 10 ml DMEM High besiyerinde çözündürüldü. Çeşitli konsantrasyonlarda (100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1, μ M 0,5 μ M, 0 μ M) standartlar ayarlandı [105].

Üre Agar Bazi

24 g üre agara 950 ml damıtılmış su eklendi. Sık sık çalkalayarak ısıtıldı ve tamamen çözülmesi için 1 dk kaynatıldı. 10 lbs basınçta 115 °C sıcaklıkta 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. 50 °C sıcaklığa soğutulduktan sonra agar bazına 50 ml steril %40 üre solüsyonu eklendi. İyice karıştırılarak steril tüplere dağıtıldı ve eğik pozisyonda bekletildi [106].

Kristal Viyole

2 g kristal viyole 20 ml %95 etil alkol içerisinde çözündürüldü. 0.8 g amonyum oksalat monohidrat, 80 ml deiyonize su içinde çözüldü. Kristal viyole boyasını yapmak için kristal viyole ve amonyum oksalat monohidrat çözeltilerini karıştırıldı [106].

Bazik Fuksin

20 ml %95 etanol içinde 0,5 g bazik fuksin boyası çözüldü. Distile su ile 100 ml'ye seyreltildi. Whatman No. 31 filtre kağıdı ile filtre edilerek süzüldü [107].

Lugol (İyot Çözeltisi)

1 g iyodür, 2 g potasyum iyodür 20 ml distile suda çözündürüldü. Son hacim distile su ile 300 ml'ye tamamlandı. Süzildükten sonra koyu renkli şişelerde muhafaza edildi [108].

3.1.4 Besiyerleri

-Yüksek Glikozlu Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM High)

DMEM High Glucose besiyerine 50 µg/ml penisilin/streptomisin oranlarında hazırlanarak +4 °C'de kullanıma hazır ve steril bir şekilde muhafaza edildi [105].

-RPMI-1640 Besiyeri

RPMI 1640 besiyerine 50 µg/ml penisilin/streptomisin oranlarında hazırlanarak +4 °C sıcaklıkta kullanıma hazır ve steril bir şekilde muhafaza edildi [105].

-Kanlı Agar

1 litre distile su içinde 40 g besiyeri süspanse edildi. Tamamen çözünmesi için kaynatıldı ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Kanlı agar için, 45-50 °C'ye soğutuldu ve aseptik olarak %6 steril defibrine edilmiş kan eklendi [109].

-Tryptic Soy Broth (TSB)

30 g besiyeri 1 litre arıtılmış filtrelenmiş suda süspanse edildi. Sık sık çalkalayarak ısıtıldı ve bir dakika kaynatıldı. 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi ve 45-50 °C'ye soğutuldu. Yavaşça karıştırılıp steril petri kutularına dağıtıldı [110].

3.1.5 Hücre Hatları

RAW 264.7 fare makrofaj hücresi monolayer bir hücre hattıdır. Pasajlama sırasında tripsin kullanılır. Sitotoksisite çalışmalarında ve nitrik oksit tayinlerinde kullanıldı.

3.1.6 Mikroorganizmalar

-*Brucella abortus*

Zoonotik bir hastalık olan Bruselloz'a sebep olan mikroorganizmadır.

3.2 Metod

3.2.1 *Brucella abortus* Kültürünün Yapılması

Kanlı agar üzerinde mikroaerofilik ortamda %10 CO₂ içeren 37 °C sıcaklıkta 72 saat süreyle inkübe edildi. Öze yardımıyla tek koloni alınarak TSB sıvı besiyerine aktarıldı ve yine %10 CO₂ içeren 37 °C sıcaklıkta 72 saat inkübe edildi. 0,5

McFarland (yaklaşık $1-2 \times 10^8$ CFU/ml eşittir) standardına göre OD600 nm 0,1-0,2A değerine ayarlandı [111].

3.2.5 Kriyobanktan RAW 264.7 Fare Makrofaj Hücrelerinin Çıkarılması ve Kültürünün Yapılması

RAW 264.7 fare makrofaj hücreleri sıvı azot içeren kriyobanktan çıkarıldı. 37 °C’de çözdürülen kriyotüp içerisindeki hücreler, %10 FBS içeren DMEM-High besiyeri içeren 15 ml falkona alındı. 1000 rpm 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti uygun besiyeri ile toplam hacim 1 ml olacak şekilde tamamlanarak sayımı gerçekleştirildi, T25’lik hücre kültür flasklarına aktarıldı. %5 CO₂ içeren 37 °C etüv, hücrelerin kültür periyodu boyunca inkübasyon ortamı olarak kullanıldı [112].

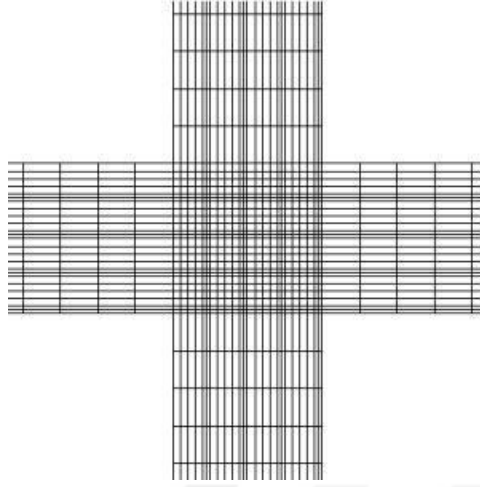
Hücre Kültürünün Tripsinizasyonu

Hücre canlılıklarının %80 - %90 olduğu düzeyde, yaklaşık 7-10 gün sonunda, hücreler flaskların yüzeyini kaplamış haldeyken ilk pasajları gerçekleştirildi ve böylece hücrelerin devamlı kültürü elde edildi. Bu amaçla hücre ortamındaki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücre kültür flaskı PBS ile yıkandı. T25’lik flaska 1 ml, T75’lik flaska 2 ml eklenerek %5 CO₂ içeren 37 °C etüvde hücrelerin flask yüzeyinden kalkması sağlandı. Flask yüzeyinden kalkan hücrelerin üzerine tripsin aktivitesini durdurmak amacıyla uygun besiyerinden eklendi ve hücreler steril serolojik pipet yardımıyla toplanarak 15 ml falkona aktarıldı. Falkondaki hücre süspansiyonu 1000 rpm 5 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti toplam hacim 1 ml olacak şekilde tamamlandı ve sayımı gerçekleştirildi [112].

Hücre Sayımı

Toplam hacim 1 ml olacak şekilde hazırlanmış olan hücre süspansiyonundan 2 µl, 48 µl uygun besiyeri, 50 µl tripan mavisi ile 100 µl olarak boyanmış hücre süspansiyonu bir eppendorf tüpünde tamamlandı. Mevcut boyanmış hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve thoma laminin iki tarafına lamin kenarı boyunca yüklendi. Şekil 3.1 görüntüsünde mevcut olan thoma lamı çizgileri içindeki

hücreler mikroskopta incelendi, aşağıdaki denkleme göre hücre sayımı gerçekleştirildi ve hücrelerin flaska ekimi yapıldı [105].



Şekil 3.1 Thoma lamı çizgi görünümü

Canlı hücre sayısı (1ml) = Ortalama canlı hücre sayısı x Sulandırma katsayısı x Thoma lamı Sabiti (10.000)

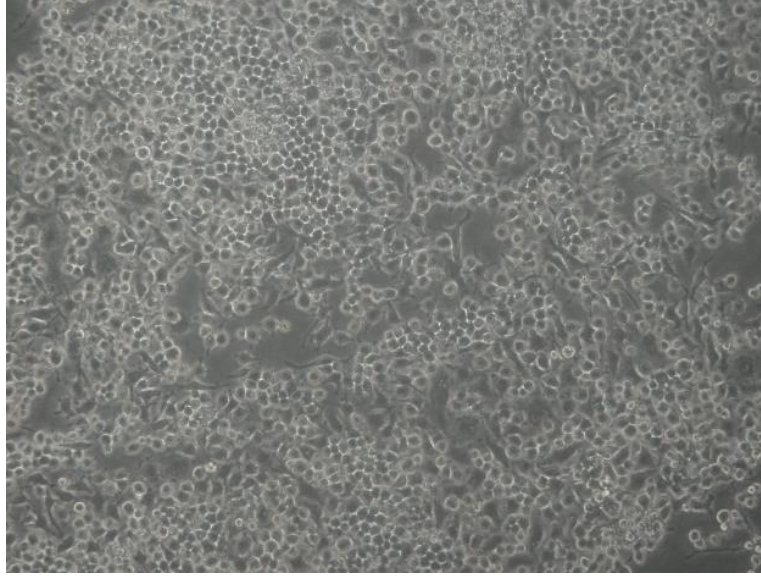
Ortalama hücre sayısı: Thoma lamının alt ve üst kısımlarında bulunan 16 karedeki canlı hücrelerin aritmetik ortalaması

Sulandırma katsayısı: Pelletten alınan hücrelerin sayımı için yapılmış sulandırma katsayısı

Thoma lamı sabiti: 10.000

Hücre süspansiyonunda ml’de bulunan hücre sayısını hesaplamak için üzerinde üçlü çizgilerle ayrılmış 16 büyük kareden oluşan, üzerinde yivler bulunan 1mm²lik alan değerlendirilir. En çok uygulanan hücre sayım yöntemi hücre canlılık yöntemi olarak da uygulanan tripan mavisi yöntemidir [105].

Eş zamanlı olarak pasajı yapılacak olarak görülen hücrelerin (Şekil 3.2) dondurma solüsyonu yardımıyla kriyoprezervasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 3.2 RAW 264.7 fare makrofaj hücreleri ters mikroskop görüntüsü (10x)

Hücre Kriyoprezervasyonu

Hücrelerin kriyoprezervasyonu için %90 FBS ve %10 DMSO içeren kriyoprotektan hazırlandı. Pasaj sonrası hücrelerin sayımı gerçekleştirildi ve 1 ml kriyotüp içine 10^6 hücre olacak şekilde 50:50 oranında hücre/kriyoprotektan konularak (hücreler kriyoprotektan üzerine damla damla bırakılır) dondurma işlemi başlatıldı. 1 saat +4 °C, 2 saat -20 °C, 4 saat -40 °C’de bekletildi ve -196 °C’de (sıvı azot) kriyobanka aktarıldı [105].

3.2.6 Rekombinant Proteinlerin ve PLGA Nanoformülasyonlarının Eldesi, Karakterizasyonu

FBA-2022-4648 kodlu Yıldız Teknik Üniversitesi BAP projesi kapsamında Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü bünyesinde EipB ve Omp25 rekombinant proteinleri üretilmiş olup Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü bünyesinde PLGA ile enkapsülasyonu yapılmıştır. Akabinde bu tez çalışmasında yer alan araştırmaların gerçekleştirilmesi için Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı’nda in vitro ve in vivo çalışmaları yürütülmüştür. İn vivo çalışmalardaki fare immunizasyon ve sakrifikasyon aşamaları ise Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.7 Nanoformülasyonların ve Rekombinant Proteinlerin RAW 264.7 Fare Makrofaj Hücreleri Üzerinde Sitotoksosite Analizlerinin Yapılması

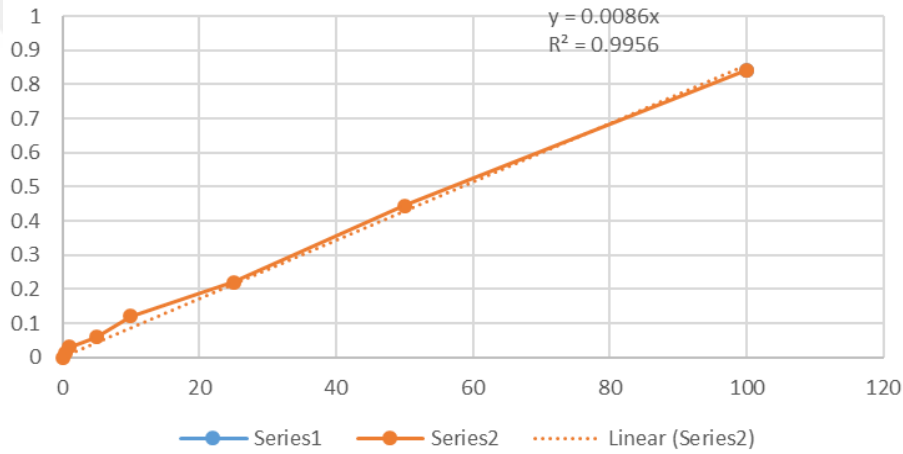
B. abortus'a karşı immünizasyon çalışmalarında kullanılacak olan rekombinant proteinlerin ve nanoformülasyonların miktarı büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple deney hayvanlarının immünizasyonundan önce RAW 264.7 fare makrofaj hücrelerinin üzerinde in vitro sitotoksosite tayini çalışmaları ile rekombinant proteinlerin ve nanopartiküllerin aşı formülasyonlarında kullanılacak olan konsantrasyonları belirlenmiştir.

Kültürü devam eden RAW 264.7 fare makrofaj hücreleri üzerinde sitotoksosite analizi için 96 kuyulu plaka 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekimleri gerçekleştirildi. 24 saat %5 CO₂ içeren 37 °C etüvde inkübe edildi. Daha sonra çeşitli konsantrasyonlarda (2 µg/ml, 4 µg/ml, 16 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml) rekombinant protein ve nanopartiküllerin formülasyonları besiyeri ile ayarlanarak hücrelerle muamele edildi ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun sonunda 10 µl/kuyu MTT solüsyonundan eklendi. 4 saat CO₂ içeren 37 °C etüvde inkübasyona bırakıldı. Plakalar mikroskopta incelendi ve farmazon kristallerinin oluşumu gözlemlendiğinde kristallerin çözünmesi için 100 µl/kuyu DMSO eklendi ve 30 dk karanlıkta bekletilip ELISA okuyucuda 560 nm ölçüm alındı [105].

3.2.8 Nanoformülasyonların ve Rekombinant Proteinlerin RAW 264.7 Fare Makrofaj Hücreleri Üzerinde Nitrik Oksit Analizlerinin Yapılması

Nitrik oksit, bağışıklık sisteminde role sahiptir ve bu çalışmada da rekombinant proteinlerin immünoestimulan etkinliğinin tayin edilmesindeki adımlarda yer aldı. Toksik olmadığı kanıtlanan rekombinant protein ve nanoformülasyon konsantrasyonlarının deney hayvanlarına uygulanmadan önce makrofaj hücreleri üzerindeki NO üretme potansiyeli belirlendi. Bu amaçla kültürü devam eden RAW 264.7 fare makrofaj hücreleri 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plakaya ekildi ve bir gece %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda 10 µg/ml LPS ile uyarıldı. LPS ile aktive edilen hücreler 1 gece daha inkübatörde bekletildi ve inkübasyon sonunda makrofaj hücrelerine rekombinant proteinler ve nanoformülasyonları verilerek 72 saat %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edildi. Inkübasyon bitiminde her bir kuyudan süpernatantlar farklı

eppendorflara toplandı ve NO tayini yapılacak zamana kadar -20 °C sıcaklıkta muhafaza edildi. Griess reaktifi ile NO tayini yapılacağı zaman farklı eppendorflara toplanmış olan süpernatantlardan 50'şer µl 96 kuyulu plakanın her kuyusuna eklendi ve örneklerin üzerine 50 µl Griess reaktifi eklenerek 10 dk karanlık ortamda saklandı. Aynı zamanda 96 kuyulu plakanın belli kuyularına standart nitrit solüsyonlarının farklı konsantrasyonlarından da eklendi ve Griess reaktifi ile muamele edilip 10 dk karanlık ortamda saklandı. 10 dk'lık inkübasyon süresinin ardından kuyulardaki absorbans değerleri ELISA okuyucuda 540 nm dalga boyunda ölçüldü. Standartlardan elde edilen absorpsiyon değerleri yardımıyla kalibrasyon eğrisi çizildi ve her bir formülasyona ait farklı konsantrasyonlar için kuyulardaki NO değerleri bu eğri yardımıyla hesaplandı [105].



Şekil 3.3 Nitrik oksit standartları kalibrasyon eğrisi

NO standartlarından elde edilmiş olan Şekil 3.3'te görülen grafik ile " $y=0,0086x$ " denklemi ve R^2 değerleri elde edildi. Mevcut denklemdeki absorbans değerleri y eksenini ile, konsantrasyon değerleri ise x eksenini ile gösterildi. Denklemden yararlanılarak, ELISA okuyucuda elde edilmiş olan absorbans değerleri y ekseninde yerine yazıldığında x eksenindeki konsantrasyon miktarları elde edildi [105].

3.2.9 Deney Hayvanları İçin Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması

İn vitro çalışmalar ile konsantrasyonları belirlenen formülasyonların, etik kurul onayı alınarak deney hayvanlarında immünostimulan etkinliğinin tayini aşamasına geçildi.

Deney Hayvanlarının Gruplandırılması

35 adet 6-8 haftalık BALB/c fareler Tablo 3.1’de görüldüğü gibi immünizasyon için gruplandırıldı:

Tablo 3.1 Deney hayvanlarını gruplandırma tablosu

Grup isimleri	Formülasyon İçeriği
1. Grup	PBS
2. Grup	rOmp25 proteini
3. Grup	rEipB proteini
4. Grup	rOmp25 proteini + rEipB proteini
5. Grup	rOmp25 proteini PLGA nanoformülasyonu
6. Grup	rEipB proteini PLGA nanoformülasyonu
7. Grup	rOmp25 proteini + rEipB proteini PLGA nanoformülasyonu

Gruplandırma neticesinde (Şekil 3.4) grup başına 5 hayvan düşecek şekilde kafeslere yerleştirildiler.



Şekil 3.4 Deney hayvanlarının gruplandırılması

Aşı Formülasyonlarının Hazırlanması

-20 °C sıcaklıkta muhafaza edilen rOmp25 proteini, rEipB proteini ve PLGA nanoformülasyonları oda sıcaklığında hassas terazide tartıldı ve PBS'te çözündürüldü. Fare başına 100 µl olacak şekilde hazırlanmış olan formülasyonlar soğuk zincir sistemiyle deney hayvanları merkezine ulaştırıldı ve 0,5 ml enjektörlere alındı [113].

3.2.10 Deney Hayvanlarının İmmünizasyonu, Kan Serumlarının Eldesi

Hazırlanmış ve enjektörlere alınmış olan aşı formülasyonları gruplandırılmış olan farelere her fareye 100 µl olarak kas içinden enjekte edildi ve dört hafta süre ile immün sistem uyarılması için bir daha enjeksiyon yapılmadı. Farelerden kan alımı sıradaki enjeksiyon yapılmadan önce mandibular venden gerçekleştirildi. Fare başına 200 µl alınan kan grup başına bir eppendorf olacak şekilde toplandı ve 4000 rpm 20 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonucunda elde edilen süpernatantlar yeni eppendorflara alındı ve -40 °C sıcaklıkta muhafaza edildi. Farelerin aşılama rejimi 4 haftada bir olarak uygulandı [113].

3.2.11 Kan Serumlarından Antikor Miktarlarının Tayini

İmmünizasyon çalışmaları başlatılmış olan farelerin antijenik rekombinant proteinler ve nanoformülasyonlara karşı gösterdiği spesifik immün yanıtın (antikor) tayini amacıyla 96 kuyulu plakaya antijen kaplaması gerçekleştirildi. Antijen kaplaması için rOmp25 ve rEipB proteinleri kullanıldı. Santrifüj sonucu elde edilmiş olan serumlar, fare gruplarına verilen formülasyonlara göre kaplanmış kuyulara uygun olarak verildi (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 96 kuyulu plakaya kaplama yapılması için antijenlerin gruplandırılması

Grup isimleri	Formülasyon İçeriği
1. Grup	PBS
2. Grup	rOmp25 proteini
3. Grup	rEipB proteini
4. Grup	rOmp25 proteini + rEipB proteini
5. Grup	rOmp25 proteini
6. Grup	rEipB proteini
7. Grup	rOmp25 proteini + rEipB proteini

96'lı Kuyulu Plakaların Antijenler ile Kaplanması ve Spesifik ELISA Plaka Üretimi

Kaplama solüsyonu hazırlanırken 9,9 ml kaplama tamponuna 0,1 ml stok antijen solüsyonu (1mg/ml) koyuldu. Bu solüsyondan kuyu başına 100 µl plakalara koyuldu ve üzeri aliminyum folyo ile kapatıldı, 4 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda 96 kuyulu plaka, PBST ile 3 defa yıkandı. Her yıkamada kuyu başına 300 µl PBST kullanılarak işlem sürdürüldü [113].

96'lı Kuyulu Plakaların Bloklanması

Bloklama işlemi sayesinde kullanılacak serum ve sekonder antikorun ELISA plağına bağlı serbest polimer uçlarına bağlanması engellenir. Bloklama işlemi süt tozu ile gerçekleştirildi. Plakanın yıkama işleminin ardından bloklama çözeltisinden kuyulara 150 µl eklendi ve 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun

sonunda 96 kuyulu plaka, PBST ile 3 defa yıkandı. Her yıkamada kuyu başına 300 µl PBST kullanılarak işlem sürdürüldü [113].

Kuyulara Kan Serumlarının Eklenmesi

-40°C'ye koyulan fare kan serumları çıkarılıp oda sıcaklığında erimeye bırakıldı. Erime tamamlandıktan sonra serumlar istenilen dilüsyonlarda PBSTM içinde sulandırıldı. Sulandırma işleminden sonra kuyu başına 120 µl olacak şekilde eklendi ve 1 saat 37 °C'deki karbondioksitsiz inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda 96 kuyulu plaka, PBST ile 3 defa yıkandı. Her yıkamada kuyu başına 300 µl PBST kullanılarak işlem sürdürüldü [113].

Kuyulara Sekonder Antikorların Eklenmesi

İlk olarak sekonder antikorların seyreltme işlemi gerçekleştirildi. Alkelen fosfataz konjuge Policlonal Anti-Mouse IgG keçi antikor 1/1000 oranında PBST ile sulandırıldı. Sulandırılma işleminden sonra her kuyuya 100 µl eklendi. Plate 1 saat 37 °C'deki CO₂ içermeyen inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda 96 kuyulu plaka, PBST ile 5 defa yıkandı. Her yıkamada kuyu başına 300 µl PBST kullanılarak işlem sürdürüldü [113].

Kuyulara Alkalen Fosfataz Substratının Eklenmesi

Yıkama işleminden sonra kuyulara substrat çözeltisinden (substrat ilaveli substrat tamponundan) 100 µl eklendi. 96 kuyulu plaka alüminyum folyo ile sarılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30-45 dk inkübe edildi [113].

Sonuçların Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

ELISA okuyucu 405 nm dalga boyuna ayarlandı ve 96 kuyulu plakanın okuması gerçekleştirildi [113].

3.2.12 Deney Hayvanlarında Koruma Deneyinin Gerçekleştirilmesi

Rekombinant Omp25 ve EipB proteinlerinin ve PLGA nanoformülasyonlarının virülan endemik smooth *B. abortus* strainine (Br5) karşı korumadaki gücünü belirlemek için proteinler ve nanoformülasyonlarla aşılanmış BALB/c farelerindeki koruma potansiyeli değerlendirildi. Bu amaçla, son aşılama 1 ay sonra, her gruptaki farelere Br5 bakterisi 10⁷ kob/ml miktarında intraperitoneal yolla enjekte edildi [114].

3.2.13 Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonu ve Dalak Örneklerinin Eldesi

Koruma deneyi için *B. abortus* bakterisinin enjeksiyonundan dört hafta sonra, fareler servikal dislokasyonla öldürüldü. Sakrifiye edilen farelerden alınan dalaklar 50 ml falkonda 10 ml serum ve antibiyotik içermeyen besiyeri ortamına koyuldu ve soğuk zincir metoduyla Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'na getirildi [115].

3.2.14 Dalak Örneklerinden Sitokin Tayinleri ve Koruma Deney Sonuçları İçin Splenositlerin Eldesi

Dalaklar laminar akışlı kabin içerisinde steril petri kabına alındı ve bisturi yardımıyla ufak bir kesik atılarak steril PBS ile yıkandı. Yıkaması tamamlanan dalaklar farklı bir petri kabında 0,70 µm filtre (süzgeç) üzerine alındı ve enjektörün arkası ile homojenizasyon işlemi gerçekleştirilirken 10 ml steril PBS adım adım eklendi. Bu işlem tamamlandıktan sonra süzgecin altında, steril petri içinde biriken hücreler toplandı ve falkona alındı. 800 rpm'de 10 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve bu işlem 2 kez PBS ile tekrarlandı. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra hücreler %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyeri ile süspanse edildi. Thoma lamında hücre sayımı gerçekleştirildi [116].

3.2.15 Deney Hayvanları Splenositlerinin Kültürünün Yapılması ve Nanoformülasyonlar, Rekombinant Proteinler ile İndüklenmesi

Elde edilmiş olan splenositlerin Thoma lamında sayımı gerçekleştirildi ve toplam miktar 4×10^6 hücre olacak şekilde 24 kuyulu plakaya ekimleri yapılarak ters mikroskopta gözlemlendi. 10 µg/ml oranında rEipB, rOmp25 proteinleri ve nanopartikülleri ile indüklendiler. 37 °C ve %5 CO₂ içeren etüvde 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon sonunda süpernatantlar toplandı, 300 g 10 dk santrifüj edildi ve -40 °C sıcaklıkta sitokin tayinleri için muhafaza edildi [116].

3.2.16 Sitokin Tayinlerinin Yapılması

Sitokin tayinleri için -40 °C sıcaklıkta muhafaza edilen süpernatant örnekleri oda sıcaklığında çözündürüldü. İnterferon gamma (IFN-γ), tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α), interlökin-12 (IL-12), interlökin-10 (IL-10), interlökin-4 (IL-4) sitokinlerinin oda sıcaklığında çözündürülmüş olan süpernatant örneklerindeki

değerleri, mevcut ELISA kitlerinin ait olduğu firmanın deney protokolüne uygun olarak belirlendi (ELK Biotechnology, Wuhan, P.R.C)

3.2.16.1 IFN- γ

Reaktiflerin Hazırlanması

Reaktifler oda sıcaklığına getirildi. 25x yıkama tamponu distile su ile 1x yıkama tamponu konsantrasyonuna seyreltildi.

1x Biotinlenmiş antikor ve 1x HRP streptavidin stok solüsyonları kullanımdan önce santrifüj ve vortex yapıldı. Akabinde Biotinlenmiş Antikor Dilüent ve HRP Dilüent yardımıyla 100 kat seyreltildi.

Standart 1000 g 1 dk santrifüj yapıldı, 1 ml dilüsyon tamponu ile seyreltildi ve 10 dk oda sıcaklığında muhafaza edildi, kibarca köpük oluşturmada pipetaj yapıldı. Yedi adet eppendorf tüpünün içerisine 0,5 ml standart seyreltme tamponundan eklendi ve tarif edildiği gibi iki kat dilüsyon serisi elde edildi. Her tüp sıradaki transferden önce kibarca pipetaj yapıldı. Seyreltilmiş standartlar 1000 pg/ml 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,63 pg/ml, ve son tüp kör olarak kullanılmak üzere 0 pg/ml olarak hazırlandı.

Tahlil Prosedürü

Kit oda sıcaklığında dengelendikten sonra, her kuyucuğa 100 μ l Standart solüsyonu (talimatlara göre kademeli olarak seyreltilmiş) ve 100 μ l numune eklendi ve 37 °C'de 80 dakika inkübe edildi.

Plakadaki sıvıyı atıldı ve her kuyucuğa 200 μ l 1×Yıkama Tamponu eklendi. Plaka 3 kez yıkandı ve döndürerek kurutmadan sonra, her kuyucuğa 100 μ l Biotinlenmiş Antikor Çalışma Solüsyonu (1×) eklendi, 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi.

Plakadaki sıvılar atıldı her kuyucuğa 200 μ l 1×Yıkama Tamponu eklendi ve plaka 3 kez yıkandı. Kuruduktan sonra her kuyucuğa 100 μ l 1×Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu eklenip 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi.

Plakadaki sıvılar atıldı ve her kuyucuğa 200 μ l 1×Yıkama Tamponu eklendi. Plaka 5 kez yıkandı. Döndürerek kurutmadan sonra, her kuyucuğa 90 μ l TMB Substrat Solüsyonu eklenip karanlıkta 20 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

Her kuyucuğa 50 µl Durdurma Solüsyonu eklendi ve plaka bir plaka çalkalayıcı üzerinde 1 dakika boyunca sallanıp OD 450 nm'de kaydedildi.

3.2.16.2 TNF-α

Reaktiflerin Hazırlanması

Reaktifler oda sıcaklığına getirildi. 25x yıkama tamponu distile su ile 1x yıkama tamponu konsantrasyonuna seyreltildi.

1x Biotinlenmiş antikor ve 1x HRP streptavidin stok solüsyonları kullanımdan önce santrifüj ve vortex yapıldı. Akabinde Biotinlenmiş Antikor Dilüent ve HRP Dilüent yardımıyla 100 kat seyreltildi.

Standart 1000 g 1 dk santrifüj yapıldı, 1 ml dilüsyon tamponu ile seyreltildi ve 10 dk oda sıcaklığında muhafaza edildi, kibarca köpük oluşturmada pipetaj yapıldı. Yedi adet eppendorf tüpünün içerisine 0,5 ml standart seyreltme tamponundan eklendi ve tarif edildiği gibi iki kat dilüsyon serisi elde edildi. Her tüp sıradaki transferden önce kibarca pipetaj yapıldı. Seyreltilmiş standartlar 1000 pg/ml 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,63 pg/ml, ve son tüp kör olarak kullanılmak üzere 0 pg/ml olarak hazırlandı.

Tahlil Prosedürü

Kit oda sıcaklığında dengelendikten sonra, her kuyucuğa 100 µl Standart solüsyonu (talimatlara göre kademeli olarak seyreltilmiş) ve 100 µl numune eklendi ve 37 °C'de 80 dakika inkübe edildi.

Plakadaki sıvıyı atıldı ve her kuyucuğa 200 µl 1×Yıkama Tamponu eklendi. Plaka 3 kez yıkandı ve döndürerek kurutmadan sonra, her kuyucuğa 100 µl Biotinlenmiş Antikor Çalışma Solüsyonu (1×) eklendi, 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi.

Plakadaki sıvılar atıldı her kuyucuğa 200 µl 1×Yıkama Tamponu eklendi ve plaka 3 kez yıkandı. Kuruduktan sonra her kuyucuğa 100 µl 1×Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu eklenip 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi.

Plakadaki sıvılar atıldı ve her kuyucuğa 200 µl 1×Yıkama Tamponu eklendi. Plaka 5 kez yıkandı. Döndürerek kurutmadan sonra, her kuyucuğa 90 µl TMB Substrat Solüsyonu eklenip karanlıkta 20 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

Her kuyucuğa 50 µl Durdurma Solüsyonu eklendi ve plaka bir plaka çalkalayıcı üzerinde 1 dakika boyunca sallanıp OD 450 nm'de kaydedildi.

3.2.16.3 IL-12

Reaktiflerin Hazırlanması

Reaktifler oda sıcaklığına getirildi. 25x yıkama tamponu distile su ile 1x yıkama tamponu konsantrasyonuna seyreltilti.

1x Biotinlenmiş antikor ve 1x HRP streptavidin stok solüsyonları kullanımdan önce santrifüj ve vortex yapıldı. Akabinde Biotinlenmiş Antikor Dilüent ve HRP Dilüent yardımıyla 100 kat seyreltilti.

Standart 1000 g 1 dk santrifüj yapıldı, 1 ml dilüsyon tamponu ile seyreltilti ve 10 dk oda sıcaklığında muhafaza edildi, kibarca köpük oluşturmada pipetaj yapıldı. Yedi adet eppendorf tüpünün içerisine 0,5 ml standart seyreltme tamponundan eklendi ve tarif edildiği gibi iki kat dilüsyon serisi elde edildi. Her tüp sıradaki transferden önce kibarca pipetaj yapıldı. Seyreltilmiş standartlar 1000 pg/ml 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,63 pg/ml, ve son tüp kör olarak kullanılmak üzere 0 pg/ml olarak hazırlandı.

Tahlil Prosedürü

Kit oda sıcaklığında dengelendikten sonra, her kuyucuğa 100 µl Standart solüsyonu (talimatlara göre kademeli olarak seyreltilmiş) ve 100 µl numune eklendi ve 37 °C'de 80 dakika inkübe edildi.

Plakadaki sıvıyı atıldı ve her kuyucuğa 200 µl 1×Yıkama Tamponu eklendi. Plaka 3 kez yıkandı ve döndürerek kurutmadan sonra, her kuyucuğa 100 µl Biotinlenmiş Antikor Çalışma Solüsyonu (1×) eklendi, 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi.

Plakadaki sıvılar atıldı her kuyucuğa 200 µl 1×Yıkama Tamponu eklendi ve plaka 3 kez yıkandı. Kuruduktan sonra her kuyucuğa 100 µl 1×Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu eklenip 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi.

Plakadaki sıvılar atıldı ve her kuyucuğa 200 µl 1×Yıkama Tamponu eklendi. Plaka 5 kez yıkandı. Döndürerek kurutmadan sonra, her kuyucuğa 90 µl TMB Substrat Solüsyonu eklenip karanlıkta 20 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

Her kuyucuğa 50 µl Durdurma Solüsyonu eklendi ve plaka bir plaka çalkalayıcı üzerinde 1 dakika boyunca sallanıp OD 450 nm'de kaydedildi.

3.2.16.4 IL-4

Reaktiflerin Hazırlanması

Reaktifler oda sıcaklığına getirildi. 25x yıkama tamponu distile su ile 1x yıkama tamponu konsantrasyonuna seyreltildi.

1x Biotinlenmiş antikor ve 1x HRP streptavidin stok solüsyonları kullanımdan önce santrifüj ve vortex yapıldı. Akabinde Biotinlenmiş Antikor Dilüent ve HRP Dilüent yardımıyla 100 kat seyreltildi.

Standart 1000 g 1 dk santrifüj yapıldı, 1 ml dilüsyon tamponu ile seyreltildi ve 10 dk oda sıcaklığında muhafaza edildi, kibarca köpük oluşturmada pipetaj yapıldı. Yedi adet eppendorf tüpünün içerisine 0,5 ml standart seyreltme tamponundan eklendi ve tarif edildiği gibi iki kat dilüsyon serisi elde edildi. Her tüp sıradaki transferden önce kibarca pipetaj yapıldı. Seyreltilmiş standartlar 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,63 pg/ml, 7,82 pg/ml ve son tüp kör olarak kullanılmak üzere 0 pg/ml olarak hazırlandı.

Tahlil Prosedürü

Kit oda sıcaklığında dengelendikten sonra, her kuyucuğa 100 µl Standart solüsyonu (talimatlara göre kademeli olarak seyreltilmiş) ve 100 µl numune eklendi ve 37 °C'de 80 dakika inkübe edildi.

Plakadaki sıvıyı atıldı ve her kuyucuğa 200 µl 1×Yıkama Tamponu eklendi. Plaka 3 kez yıkandı ve döndürerek kurutmadan sonra, her kuyucuğa 100 µl Biotinlenmiş Antikor Çalışma Solüsyonu (1×) eklendi, 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi.

Plakadaki sıvılar atıldı her kuyucuğa 200 µl 1×Yıkama Tamponu eklendi ve plaka 3 kez yıkandı. Kuruduktan sonra her kuyucuğa 100 µl 1×Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu eklenip 37°C'de 50 dakika inkübe edildi.

Plakadaki sıvılar atıldı ve her kuyucuğa 200 µl 1×Yıkama Tamponu eklendi. Plaka 5 kez yıkandı. Döndürerek kurutmadan sonra, her kuyucuğa 90 µl TMB Substrat Solüsyonu eklenip karanlıkta 20 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

Her kuyucuğa 50 µl Durdurma Solüsyonu eklendi ve plaka bir plaka çalkalayıcı üzerinde 1 dakika boyunca sallanıp OD 450 nm'de kaydedildi.

3.2.17 *Brucella abortus*'a Karşı Koruma Deneyi Sonuçlarının Elde Edilmesi

3.2.17.1 Dalak Örneklerinin Kanlı Agara Ekimi

Farelerden elde edilen dalaklardan yıkama yapıldıktan sonra her parça ayrı ayrı 2 ml %0.1 triton-PBS içerisinde homojenize edildi ve seri dilüsyonlar ile kanlı agar ortamına ekimleri gerçekleştirildi [20, 21]. %10 CO₂ içeren inkübatörde 48-72 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilerek *B. abortus* varlığı arandı.

3.2.17.2 CO₂ İhtiyacı

Saf tek tip koloni izolatları alınarak kanlı agar ortamına ekildi. Hem %10 CO₂ mikroaerofilik ortamda hem de CO₂'siz ortamda 37 °C'de inkübasyona bırakıldı ve 48 saatten sonra bakteriyel büyüme gözlemlendi [20, 24]

3.2.17.3 Gram Boyama Yapılması

Taze ve saf koloni izolatları öze yardımıyla alınarak yayma preperat hazırlandı. Preperat ateşten geçirilerek fiks edildi. Preperatın üzerine kristal viyole eklendi. 1 dakika bekletildikten sonra saf su ile yıkandı. İyot çözeltisi (lugol) damlatıldı ve 1 dakika bekletildi. Ardından alkol ile 15 saniye muamele edildi. Saf su ile yıkandı. Preperatın üzerine bazik fuksin eklendi ve 30-60 saniye bekletildi. Saf su ile yıkandı. Preperat kuruduktan sonra ışık mikroskobu ile incelendi. Pembe renkte boyanan koloniler Gr (-), mor renkte boyanan bakteriler Gr (+) olarak belirlendi [117].

3.2.17.4 Biyokimyasal Testlerin Yapılması

İnkübasyon süresinin ardından bakteriyel izolatlar koloni morfolojisi, oksidaz testi, katalaz testi ve üreaz testi kullanılarak bakteri tanımlamaları gerçekleştirildi.

Üreaz Testi

Saf koloni izolatları alınarak üreli agar ortamına transfer edildi ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı [118].

Oksidaz Testi

Bakteri kolonisi oksidaz reaktifi ile doyurulmuş filtre kağıdına sürüldü. Pozitif oksidaz testi 10 saniye içerisinde mavi-mor renk gelişimi olarak kaydedildi.

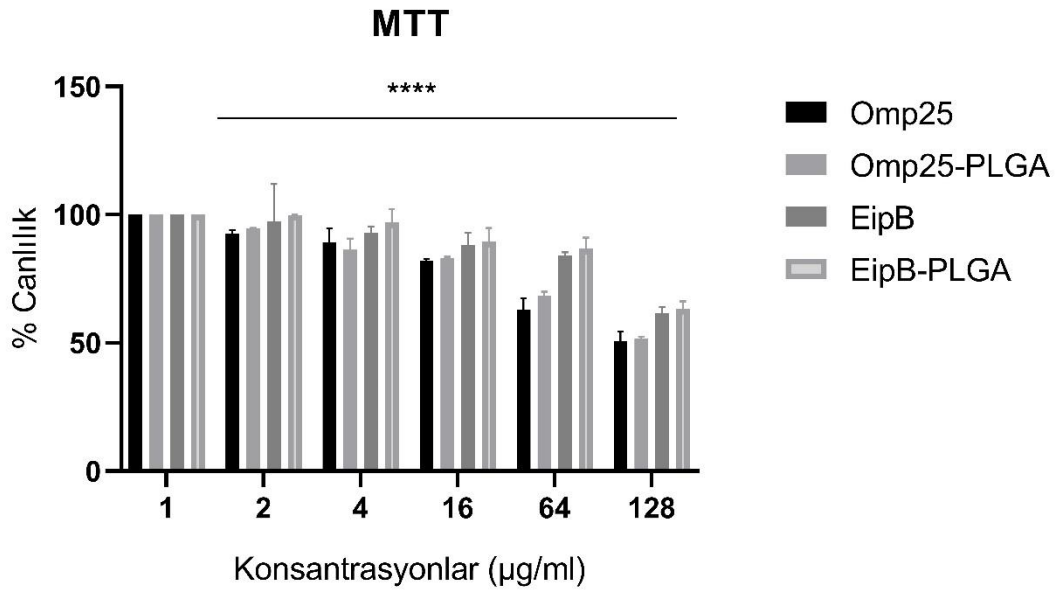
Kolonilerin hiçbir renk almaması negatif olarak, siyah renk değişimi gözlemlenmesi ise kolonilerin öldüğünün göstergesi olarak kabul edildi [119].

Katalaz Testi

Bakteri kolonisi üzerine %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi eklendiğine kabarcıkların tespit edilmesi pozitif sonucun göstergesi olarak değerlendirildi [119].



4.1 Nanoformülasyonların ve Rekombinant Proteinlerin RAW 264.7 Fare Makrofaj Hücreleri Üzerinde Sitotoksikite Analizlerinin Sonuçları



Şekil 4.1 RAW-264.7 hücreleri üzerinde sitotoksikite analiz sonuçları

Şekil 4.1’de rekombinant protein ve PLGA ile enkapsüle edilmiş rekombinant proteinlerin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan RAW-264.7 hücrelerinin canlılık seviyeleri mevcuttur. Sitotoksikite çalışmaları sonucunda 2, 4 ve 16 µg/ml konsantrasyonlarında protein ve protein içeren nanopartiküllere maruz kalan hücrelerin canlılık oranları %80’nin üzerinde gözlemlendi.

Buna karşılık 64 µg/ml konsantrasyonunda Omp25 proteinine maruz kalan gruptaki hücrelerin canlılığında %82,11 oranından %63,11 oranına düşüş gözlemlendi. Canlılık oranındaki bu azalma mevcut konsantrasyonun (64 µg/ml) canlı hücrelere bir sitotoksik etki oluşturduğunu gösterdi. Bununla birlikte Omp25 proteini içeren nanoformülasyonlar kullanıldığında tek başına Omp25 proteini uygulamasına kıyasla hücre canlılığında artış gözlemlendi. Bu artış yalnızca Omp25 proteini ile

muamele edilen gruptaki %63,11 canlılık oranından, PLGA ile enkapsüle edilmiş olan Omp25 proteiniyle muamele edilen grubun %68,42 canlılık oranına artmasıyla analiz edildi. Ancak mevcut canlılık oranında nanopartikül içeren formülasyondaki bu yükseliş kendi içinde 16 µg/ml'den 64 µg/ml değerine geçerken %83,19 canlılık oranından %68,42'e düşüş olarak karşımıza çıktı. Bu bilgiler doğrultusunda 16 µg/ml Omp25 protein ve Omp25 proteini içeren nanopartikül konsantrasyonlarının hücre canlılığı değerlendirmesinde tercih edilebilir grup olduğu söylenebilir.

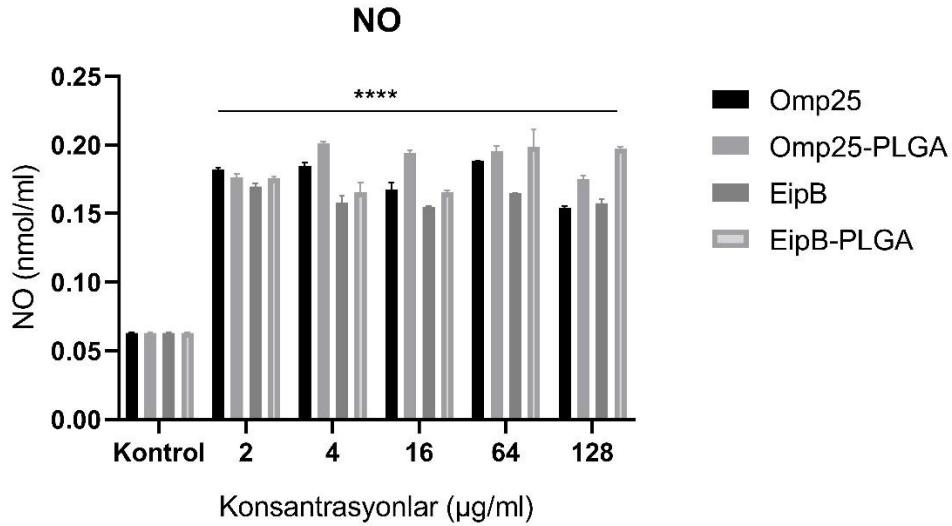
64 µg/ml konsantrasyonda ise EipB proteinine ve EipB proteini içeren nanopartiküllere maruz kalan RAW-264.7 hücrelerindeki canlılık oranlarının da %80 üzerindeki seviyelerde olduğu tespit edildi. EipB proteini kendi içinde değerlendirildiğinde 128 µg/ml konsantrasyonuna kadar ciddi bir düşüş söz konusu değilken 64 µg/ml konsantrasyonundan 128 µg/ml konsantrasyonuna geçildiğinde canlılık oranında %83,99'den %61,56 değerine düşüş söz konusudur. 128 µg/ml konsantrasyonunda EipB protein ve EipB proteini içeren nanopartiküler sistemler kendi arasında incelendiğindeyse canlılık oranının %61,56 değerinden %63,31 değerine yükseldiği görülmektedir. Bu yükseliş Omp25 proteini içeren nanopartiküllerde de olduğu gibi EipB içeren nanopartiküller sistemlerin kendi içinde mevcut değildir. Bu bilgiler göz önüne alındığında 64 µg/ml EipB protein ve nanopartikül konsantrasyonlarının hücre canlılığı değerlendirmesinde tercih edilebilir grup olduğu söylenebilir.

128 µg/ml konsantrasyonunda incelenen tüm formülasyonlar hücre canlılığında kayda değer bir düşüşe sebep oldu ($p < 0.05$). Bu konsantrasyonda Omp25 ve EipB rekombinant proteinlerine maruz kalan RAW-264.7 fare makrofaj hücrelerinin canlılık oranının %50 seviyesine gerilediği gözlemlendi. Proteinleri içeren nanopartiküllerin canlılığı da yüksek oranda düştüğünden 128 µg/ml konsantrasyonu sitotoksik etkisi yüksek olan konsantrasyon olarak değerlendirildi.

Omp25 ve EipB protein-nanopartikül formülasyonlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla; Omp25 proteini, Omp25 proteini içeren nanopartikül, EipB proteini, EipB proteini içeren nanopartiküllerin 120,64; 129,37; 182,35; 186,88 olarak karşımıza hesaplandı. Omp25 proteini içeren nanopartikül formülasyonu IC₅₀ değerinin, Omp25 proteini IC₅₀ değerinden daha yüksek olması hücrelerin %50 canlılık oranında olabilmesi için gereken formülasyon konsantrasyonunun

nanopartiküllerde daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum PLGA ile nanoformülasyon haline getirilmiş olan rekombinant Omp25 proteininin sitotoksik etkisinin düşürüldüğünü göstermektedir. Benzer şekilde EipB proteini içeren nanopartikül formülasyonu IC50 değerinin, EipB proteini IC50 değerinden daha yüksek olduğunu görmekteyiz. Bu durum da Omp25 proteininde olduğu gibi EipB proteininde PLGA ile nanoformülasyon eldesinin proteinlerin tek başına yer aldığı formülasyonlardan daha düşük sitotoksik etki gösterdiğini, hücre canlılığını olumlu yönde etkilediğini bize aktarmaktadır.

4.2 Nanoformülasyonların ve Rekombinant Proteinlerin RAW 264.7 Fare Makrofaj Hücreleri Üzerinde Nitrik Oksit Analizlerinin Sonuçları



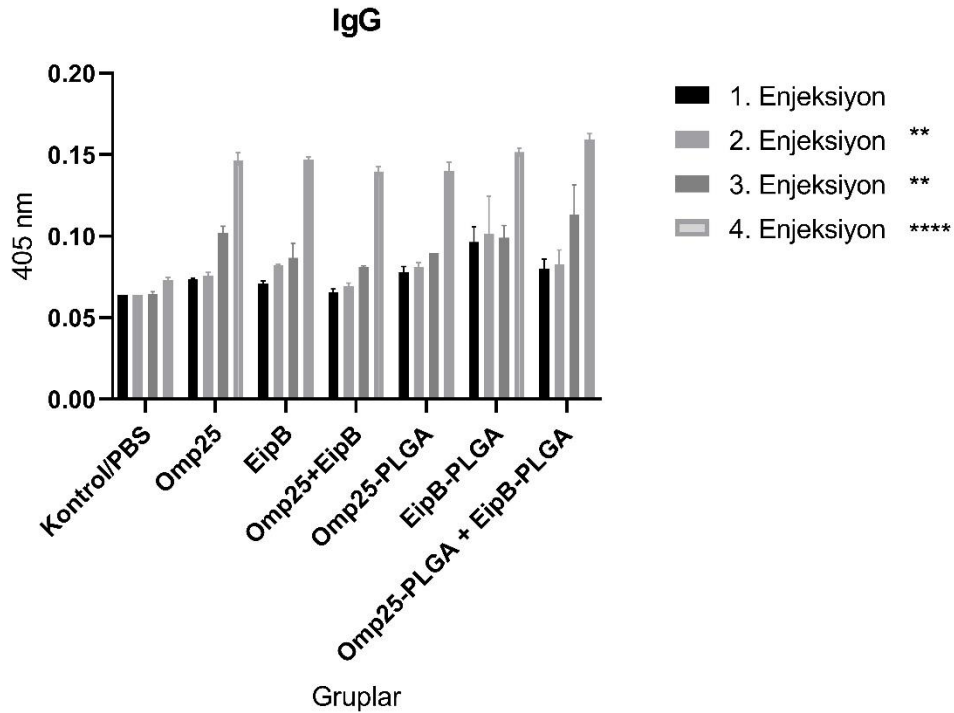
Şekil 4.2 RAW-264.7 hücreleri üzerinde NO tayini sonuçları

Şekil 4.2’de farklı konsantrasyonlara maruz bırakılan RAW-264.7 fare makrofaj hücrelerinin üretmiş oldukları nitrik oksit seviyeleri mevcuttur. İncelenen tüm konsantrasyonlardaki nitrik oksit seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde bir artış göstermiştir ($p < 0.05$). Nitrik oksit seviyesindeki bu artış tüm gruplar açısından değerlendirildiğinde 2-3 kat aralığında seyretmektedir. Omp25 proteininde genel olarak protein içeren formülasyonlardaki nitrik oksit seviyeleri nanopartiküler sistem içeren formülasyonlara göre daha düşük elde edilmiştir. EipB proteininde de nanopartiküler sistem içeren formülasyonlara maruz bırakılan

makrofajların üretmiş olduğu nitrik oksit seviyeleri daha yüksek gözlemlenmiştir. Bu durum PLGA ile enkapsülasyonun makrofajlardaki nitrik oksit üretim seviyelerini proteinlere göre yükselttiğini, immünostimulan etkinliklerini olumlu yönde değiştirdiğini doğrulamaktadır. Bu artış Omp25 proteini için en yüksek 17,74 seviyesinden 20,34 seviyesine (128 µg/ml) gerçekleşmiştir ($p<0.05$). EipB proteini içinse 18,33 seviyesinden 22,94 seviyesine (128 µg/ml) gerçekleşmiştir.

Özellikle 64 ve 128 µg/ml konsantrasyonlarda protein yüklü nanopartiküller serbest haldeki protein uygulamasına göre daha yüksek düzeyde nitrik oksit üretimini tetiklemiştir. Bu sonuçlar nanopartiküler formülasyonların, proteinlerin in vitro immünostimulan etkinliklerini arttırdıklarını göstermektedir.

4.3 Kan Serumlarından Antikor Miktarlarının Tayini

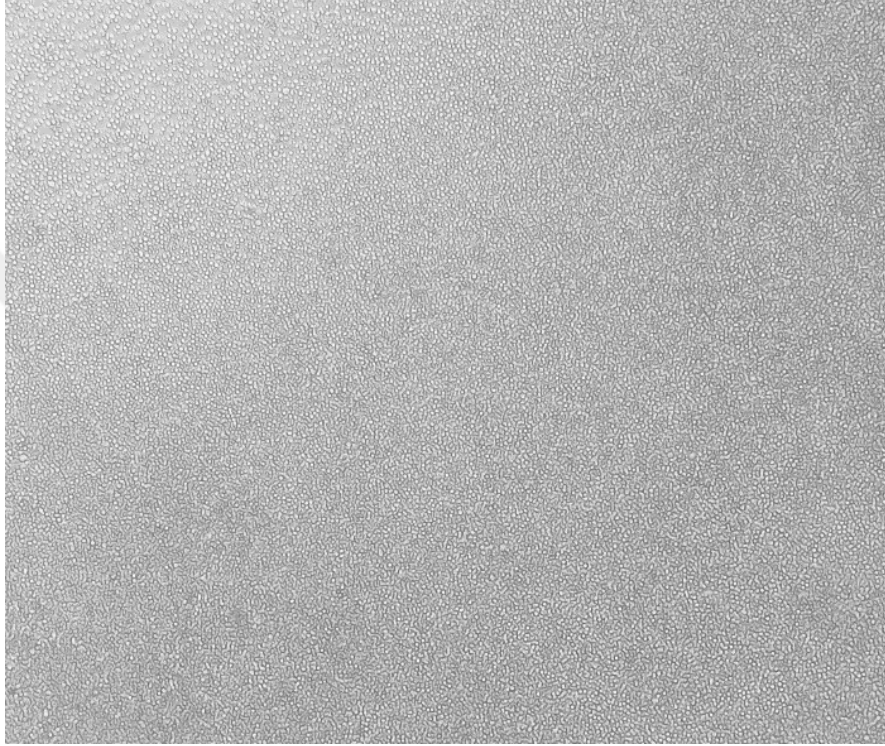


Şekil 4.3 Kan serumlarındaki antikor miktarları

16 hafta boyunca kas içi enjeksiyon metoduyla formülasyonların enjekte edildiği BALB/c farelerden her enjeksiyonun öncesinde kan örnekleri alındı ve bu örneklerden ELISA metoduyla absorbands değerlendirmesi üzerinden antikor tayinleri gerçekleştirildi. Anlamlı düzeyde antikor artışı görülene kadar immünizasyona devam edildi ve bu süreçte dördüncü kan alımının ardından fare

serumlarındaki antikor miktarı analiz edildiğinde anlamlı düzeyde antikor seviyesine ulaşıldığı değerlendirilerek farelerin sakrifikasyonu gerçekleştirildi. ELISA metoduyla serumlardaki antikor miktarı için yapılmış olan analizlerden elde edilmiş olan absorbans miktarları Şekil 4.3'te mevcuttur.

4.4 Deney Hayvanları Splenositlerinin Kültürünün Yapılması ve Nanoformülasyonlar, Rekombinant Proteinler ile İndüklenmesi



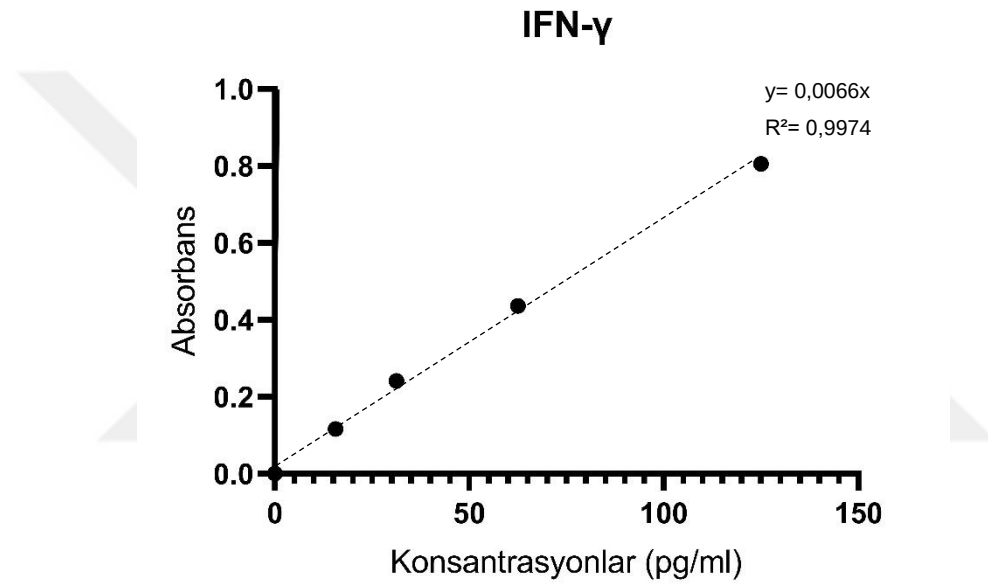
Şekil 4.4 Fare dalağından elde edilen hücrelerin ters mikroskop görüntüsü (10x)

Deney hayvanlarının sakrifikasyonunun akabinde elde edilen dalak örnekleri bir dizi işlemten geçirildi ve santrifüj yapıldı. Tekrarlı bir yıkama periyodu içeren santrifüj işleminin ardından elde edilmiş olan splenositlerin thoma lamında sayımı gerçekleştirildi ve toplam miktar 4×10^6 hücre olacak şekilde 24 kuyulu plakaya ekildi ve ters mikroskopta incelendiğinde Şekil 4.4'te görülebilen dalak hücrelerinin görüntüsü elde edildi. Mevcut hücreler, rekombinant proteinler ve nanoformülasyonlarının belirlenen konsantrasyonları ile indüklendi. 37 °C ve %5 CO₂ içeren etüvde 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldılar. Akabinde süpernatantlar alınarak santrifüj yapıldı ve -40 °C sıcaklıkta sitokin tayinlerinde kullanılmak üzere muhafaza edildi.

4.5 Sitokin Tayini Sonuçları

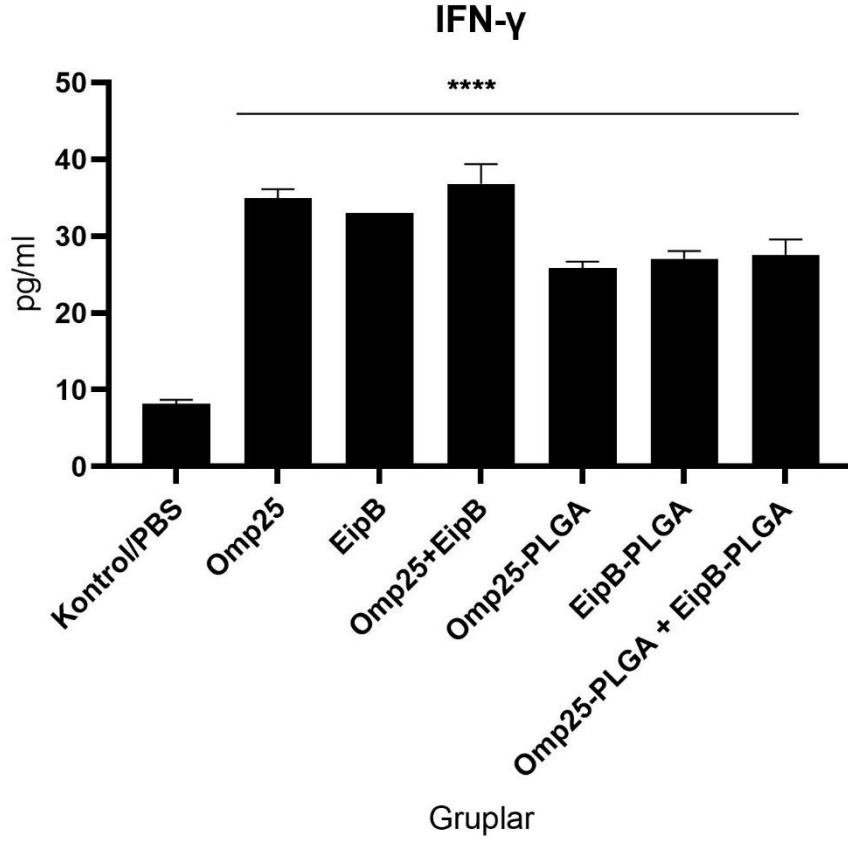
Bu tez çalışması kapsamında yapılmış olan deneyler doğrultusunda mevcut in vivo çalışmaların fare immün sisteminde Th1 yanıtını indüklemesi beklenmiştir [19, 23]. Yapılmış olan interferon gamma (IFN- γ), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin-12 (IL-12), interlökin-4 (IL-4) sitokin tayinlerinden IFN- γ , TNF- α , IL-12 konsantrasyonlarının daha yüksek olması beklenmiş nitekim bu paralellikte sonuçlar elde edilmiştir.

4.5.1 IFN- γ Sitokin Tayini Sonuçları



Şekil 4.5 IFN- γ standart grafiği

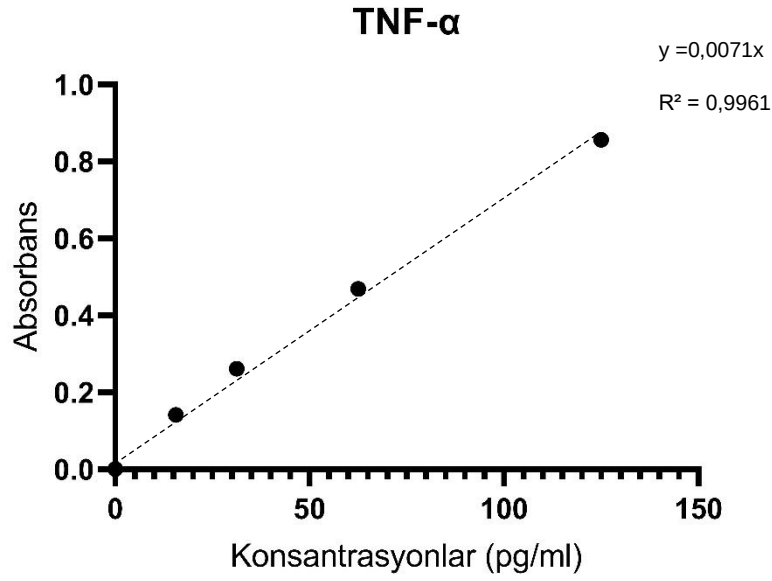
ELK Biotechnology firmasından temin edilmiş olan IFN- γ sitokininin ELISA kiti içerisindeki standartları, kitteki protokolüne göre kit içerisindeki 96 kuyulu plakaya yerleştirildi. Akabinde belirlenen sırayla kit içerisindeki solüsyonlar eklendi ve yıkama işlemleri yapıldı. ELISA okuyucuda 450 nm absorbans ölçümü alındı. Elde edilmiş olan absorbans değerleri aracılığıyla Şekil 4.5'teki standart eğrisi elde edildi.



Şekil 4.6 Fare dalaklarındaki IFN- γ sitokin konsantrasyonları

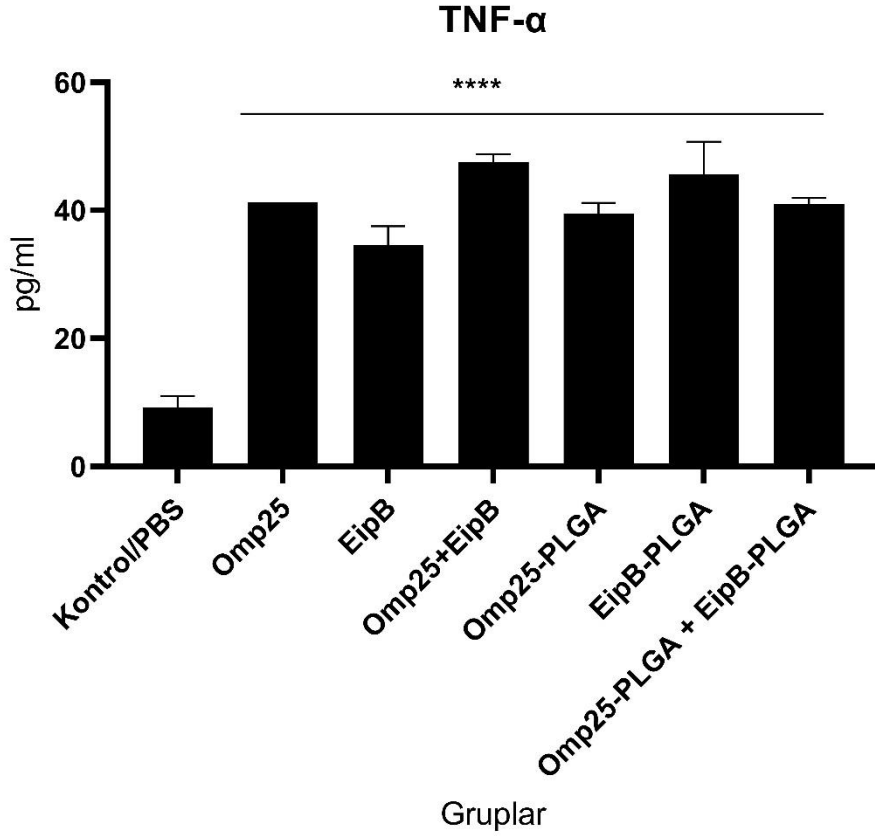
Elde edilmiş olan standart eğrisinin denklemi yardımıyla -Th1 hücreler tarafından üretilen, doğal ve adaptif bağışıklık sisteminde önemli yere sahip olan- IFN- γ sitokini absorbans sonuçları üzerinden fare dalaklarındaki IFN- γ sitokininin konsantrasyon hesaplaması yapıldı. IFN- γ sitokininin fare dalaklarındaki miktarları (Şekil 4.6) incelendiğinde, yalnızca rekombinant proteinleri (rOmp25, rEipB) içeren formülasyonların nanoformülasyonlara göre daha yüksek düzeyde IFN- γ sitokininin üretilmesini indüklediği analiz edildi ve bütün gruplarda kontrol grubuna kıyasla 3 ile 5 kat aralığında artış görüldü. Gruplar arasında çok büyük bir konsantrasyon farkı görülmemekle beraber kombine haldeki formülasyonların tekli formülasyonlara göre daha fazla indüklediği görüldü. Nanoformülasyonlarda diğer formülasyonlara göre daha düşük çıkan sitokin salımının kontrollü salım sebebiyle salım tamamlandığında daha da artış göstereceği düşünülmektedir.

4.5.2 TNF- α Sitokin Tayini Sonuçları



Şekil 4.7 TNF- α standart değerleri

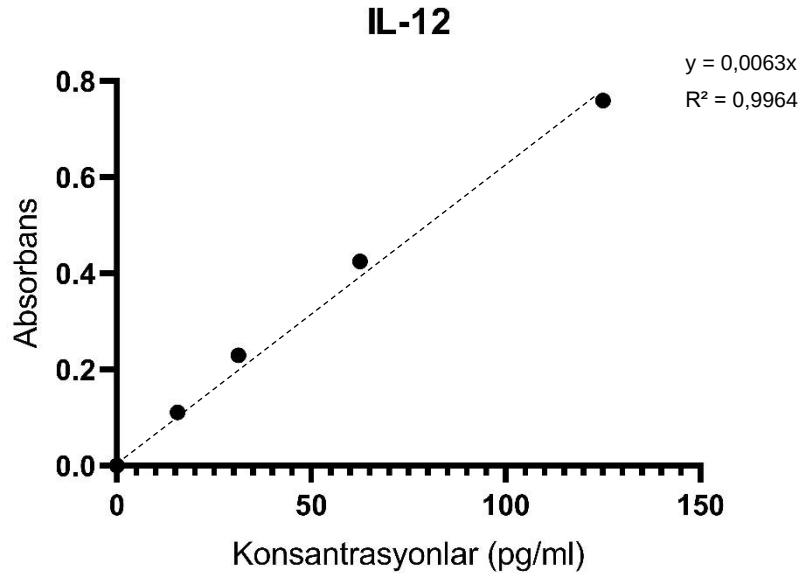
ELK Biotechnology firmasından temin edilmiş olan TNF- α sitokininin ELISA kiti içerisindeki standartları, kitteki protokolüne göre kit içerisindeki 96 kuyulu plakaya yerleştirildi. Akabinde belirlenen sırayla kit içerisindeki solüsyonlar eklendi ve yıkama işlemleri yapıldı. ELISA okuyucuda 450 nm absorbans ölçümü alındı. Elde edilmiş olan absorbans değerleri aracılığıyla Şekil 4.7'deki standart eğrisi elde edildi.



Şekil 4.8 Fare dalaklarındaki TNF- α sitokin konsantrasyonları

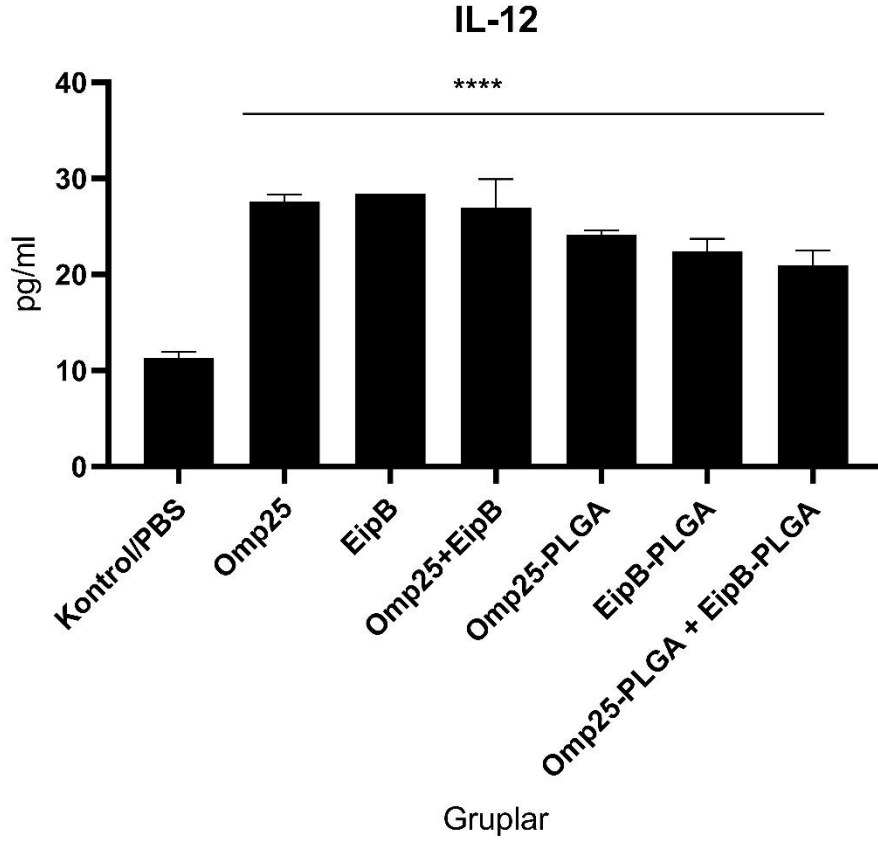
Elde edilmiş olan standart eğrisinin denklemi yardımıyla -aktifleşmiş olan makrofajlar tarafından özellikle gram negatif bakterilerin LPS'sine karşı üretilen, akut enflamasyonda önemli bir yere sahip olan- TNF- α sitokini absorbans sonuçları üzerinden fare dalaklarındaki TNF- α sitokininin konsantrasyon hesaplaması yapıldı. Bu sonuçlar doğrultusunda PBS enjekte edilmiş olan kontrol grubuyla kıyaslandığında bütün gruplar sitokin seviyesinde anlamlı düzeyde bir artış gösterdi (Şekil 4.8). Bu durum mevcut formülasyonların enflamatuvar yanıtı tetiklediği, doğal bağışıklığın söz konusu olduğu bağışıklık sistemini indüklediği sonucunu gösterdi. IFN- γ sitokininde olduğu gibi TNF- α sitokin sonuçlarında da kombine formülasyonları içeren grupların değerleri daha yüksek elde edildi ancak bütün gruplarda kontrol grubuna kıyasla 4 ile 5 kat aralığında artış görüldü. IFN- γ sitokin değerlerinde olduğu gibi nanoformülasyonlardaki TNF- α sitokin değerlerinin salım profiline bağlı olarak daha da artış göstereceği düşünülmektedir.

4.5.3 IL-12 Sitokin Tayini Sonuçları



Şekil 4.9 IL-12 sitokin standart değerleri

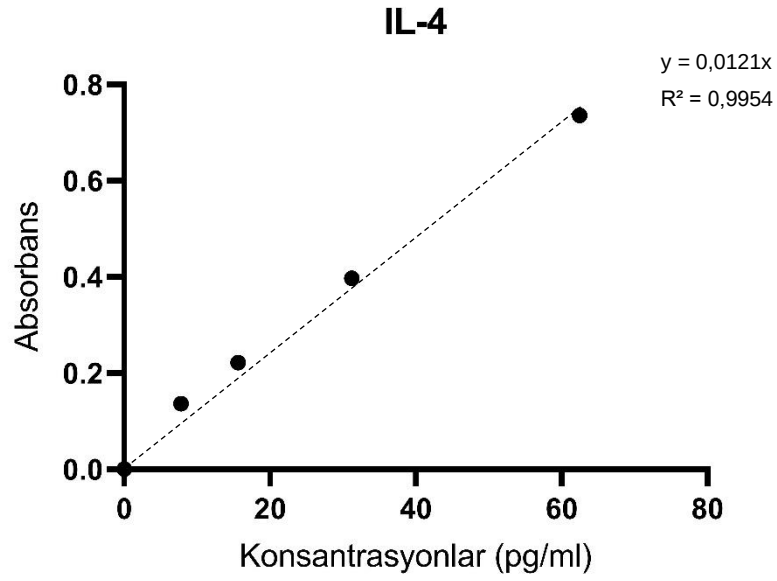
ELK Biotechnology firmasından temin edilmiş olan IL-12 sitokininin ELISA kiti içerisindeki standartları, kitteki protokolüne göre kit içerisindeki 96 kuyulu plakaya yerleştirildi. Akabinde belirlenen sırayla kit içerisindeki solüsyonlar eklendi ve yıkama işlemleri yapıldı. ELISA okuyucuda 450 nm absorbans ölçümü alındı. Elde edilmiş olan absorbans değerleri aracılığıyla Şekil 4.9'daki standart eğrisi elde edildi.



Şekil 4.10 Fare dalaklarındaki IL-12 sitokin konsantrasyonları

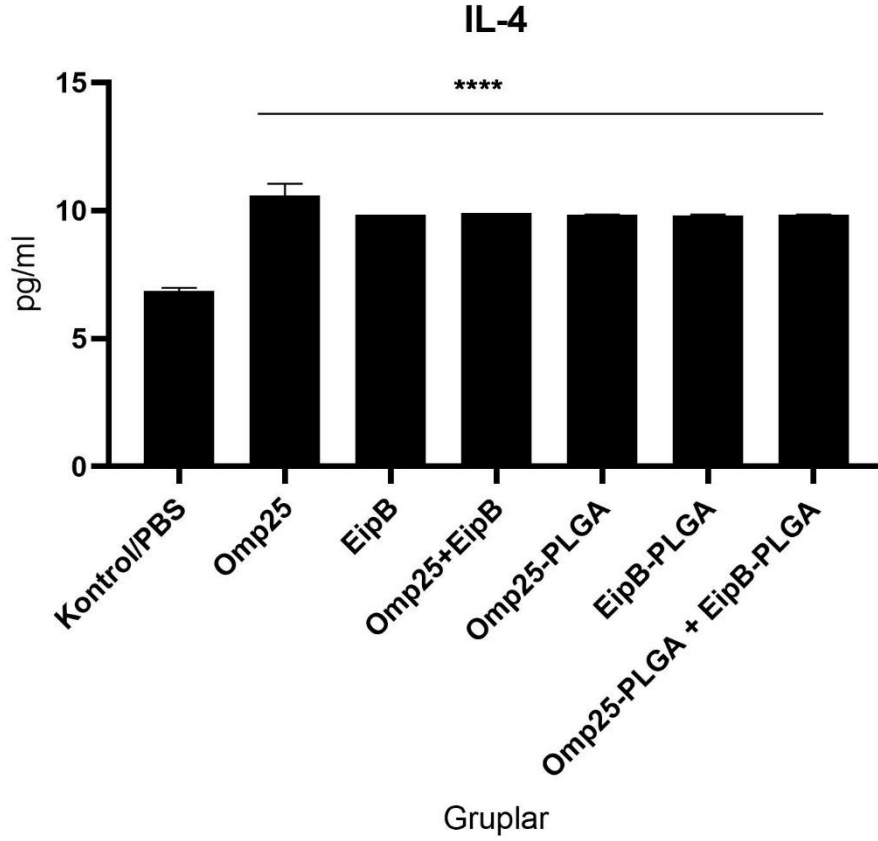
Elde edilmiş olan standart eğrisinin denklemi yardımıyla aktive edilmiş makrofajlar ve dentritik hücreler tarafından üretilen IL-12 sitokini absorbans sonuçları üzerinden fare dalaklarındaki IL-12 sitokininin konsantrasyon hesaplaması yapıldı (Şekil 4.10). Bu sonuçlar doğrultusunda PBS enjekte edilmiş olan kontrol grubuyla kıyaslandığında rekombinant protein içeren gruplar sitokin seviyesinde anlamlı düzeyde bir artış gösterdi. Rekombinant protein içeren gruplardaki IL-12 sitokin seviyesinin nanoformülasyon haline getirilmiş olan rekombinant proteinler içeren gruplardaki IL-12 seviyesine kıyasla yüksek düzeyde sitokin konsantrasyonu sonucu verdiği de kaydedildi. Bu gözlemin yanı sıra tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla 2 ile 3 kat aralığında bir artış görüldü. Bu durum mevcut formülasyonların hedeflendiği gibi Th1 yanıtını indüklediğini gösterdi. Diğer sitokin değerlerinde olduğu gibi IL-12 sitokininin de nanoformülasyonlarda kontrollü salım sebebiyle zamana bağlı olarak artacağı düşünülmektedir.

4.5.4 IL-4 Sitokin Tayini Sonuçları



Şekil 4.11 IL-4 standart değerleri

ELK Biotechnology firmasından temin edilmiş olan IL-4 sitokininin ELISA kiti içerisindeki standartları, kitteki protokolüne göre kit içerisindeki 96 kuyulu plakaya yerleştirildi. Akabinde belirlenen sırayla kit içerisindeki solüsyonlar eklendi ve yıkama işlemleri yapıldı. ELISA okuyucuda 450 nm absorbans ölçümü alındı. Elde edilmiş olan absorbans değerleri aracılığıyla Şekil 4.11'deki standart eğrisi elde edildi.



Şekil 4.12 Fare dalaklarındaki IL-4 sitokin değerleri

Elde edilmiş olan standart eğrisinin denklemi yardımıyla makrofajlar ve Th2 hücreleri tarafından üretilen IL-4 sitokini absorbans sonuçları üzerinden fare dalaklarındaki IL-4 sitokininin konsantrasyon hesaplaması yapıldı (Şekil 4.12). Hem nanoformülasyon hem de rekombinant proteinlerden oluşan formülasyonların değerlerinden kontrol grubuna yakın sonuçlar elde edildi. Sonuçlar analiz edildiğinde ve diğer sitokin sonuçlarıyla kıyaslandığında Th1 yanıtının indüklendiği bir kez daha dikkat çekmiştir.

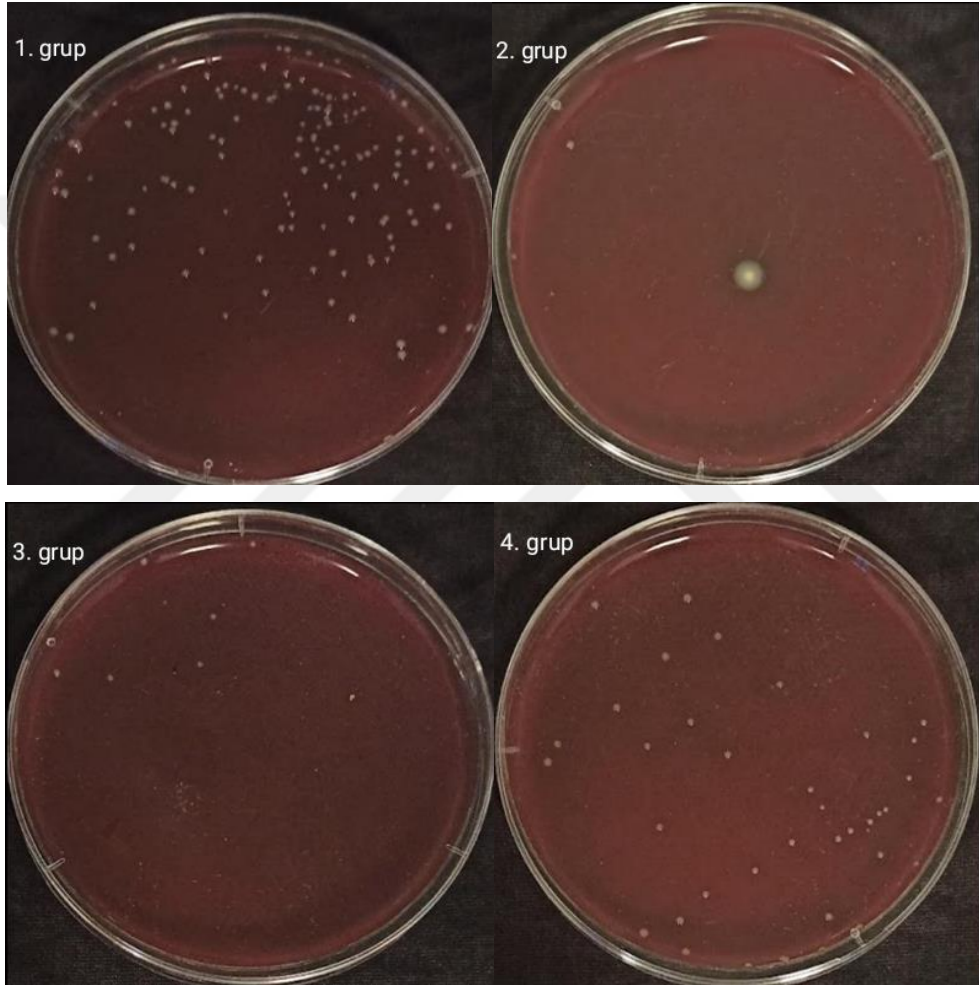
4.6 *Brucella abortus*'a Karşı Koruma Deneyi Sonuçları

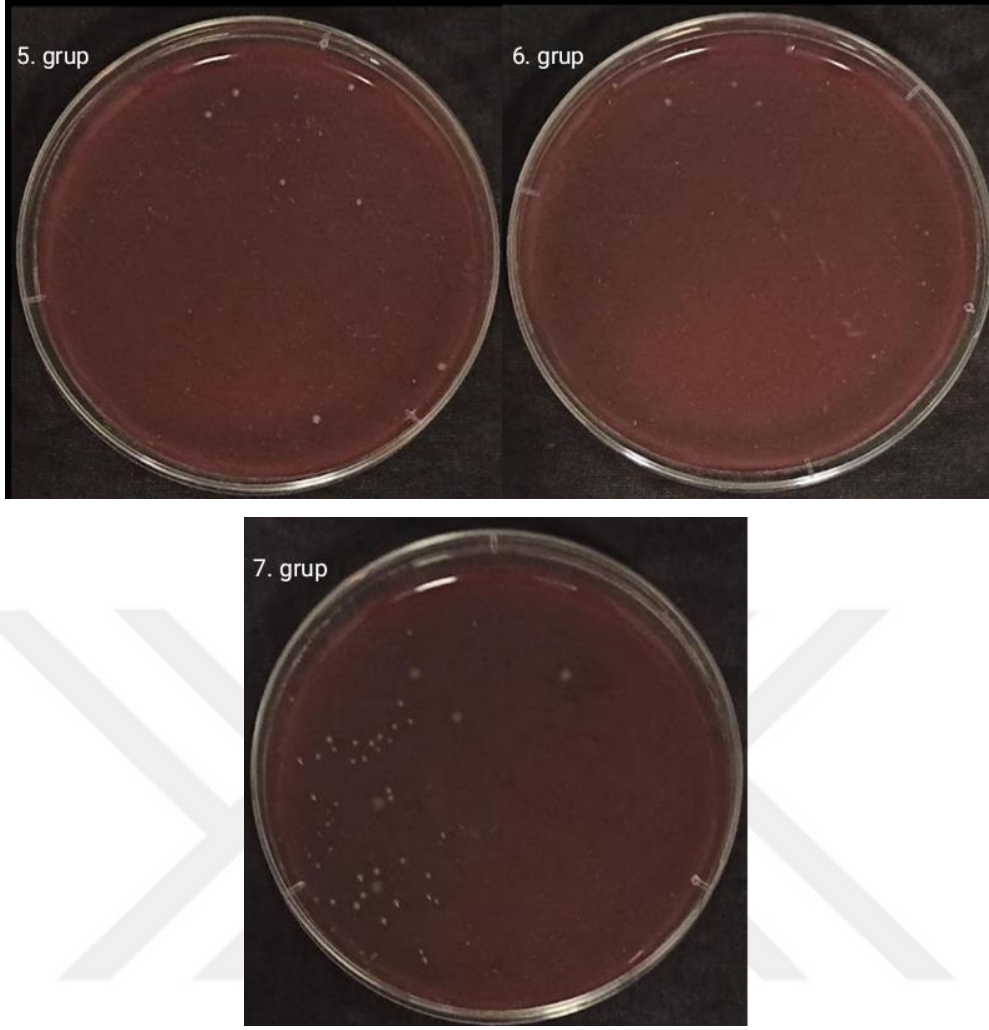
4.6.1 Dalak Örneklerinin Kanlı Agara Ekim Sonuçları

Bu çalışmada farklı fare gruplarının dalaklarında *Brucella abortus* tespit çalışması gerçekleştirildi. *Brucella* türleri sistemik bir enfeksiyon hastalığı olan Bruselloza neden olur. *Brucella abortus*, hayvanlarda ve insanlarda Bruselloz hastalığının ana

nedenidir [120]. *Brucella*'nın tanımlamasını gerçekleştirmek için CO₂ ihtiyacının belirlenmesiyle birlikte, katalaz, oksidaz, üreaz testi ile gram boyama yapıldı [121].

Kanlı agar ortamına yayma metoduyla ekimi gerçekleştirilen dalaklar neticesinde kanlı agardaki *Brucella* kolonilerinin görüntüleri Şekil 4.13'te görülmektedir. Dalaklardan elde edilen örnekler de gözlemlenen Şekil 4.13'teki kolonilerin morfolojisi smooth olarak gözlemlendi. Corbel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da *Brucella* bakterisinin smooth olduğu belirtilmiştir [111].





Şekil 4.13 Kanlı agara ekimi gerçekleştirilen dalak örneklerinin inkübasyon sonrası görüntüleri

Tüm gruptaki örnekler 10 kat seyreltilerek agara ekimleri gerçekleştirildi. Ekim neticesinde 72 saatlik inkübasyonun ardından mevcut agarlardaki koloni sayıları hesaplandı.

Tablo 4.1 Yayma metoduyla kanlı agara ekimi gerçekleştirilen dalak örneklerindeki *Brucella abortus* üreme miktarlarının gruplara göre koloni sayıları

Grup	1	2	3	4	5	6	7
Koloni Sayısı	1310	20	80	410	80	110	570

Agardaki bakteri üreme miktarı üzerinde analiz yapıldığında Tablo 4.1’de görüldüğü gibi 1. grupta yer alan *B. abortus* üreme miktarı yalnızca PBS verilmiş olan farelerin dalaklarına aittir ve bu durumda negatif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. 2. ve 3. grupların agar sonuçlarına ve koloni miktarlarına baktığımızdaysa kontrol grubuna göre *B. abortus* üreme miktarının oldukça yüksek oranda azaldığı görülmektedir. Rekombinant proteinlerin kombine halinden oluşan 4. gruptaysa, 1. gruba nazaran agardaki koloni sayısında gözle görülür düzeyde bir azalma mevcutken rekombinant proteinleri ayrı ayrı içeren 2 ve 3. gruplara göre koloni sayısındaki azalma düşük kalmıştır. Nanoformülasyonların enjekte edildiği 5, 6 ve 7. gruplar incelendiğinde 5 ve 6. grupların yalnızca rekombinant protein içeren 2 ve 3. gruplardaki gibi kontrol grubuna kıyasla koloni sayısında ciddi oranda azalma gösterdiği görülmektedir. Nanoformülasyonların kombine halini içeren 7. grup farelerinin dalaklarının ekildiği kanlı agarlarda gözlemlenen koloni miktarı ise kontrol grubuna göre düşüş göstermişken diğer gruplara nispeten bu düşüş oranı az olmuştur.

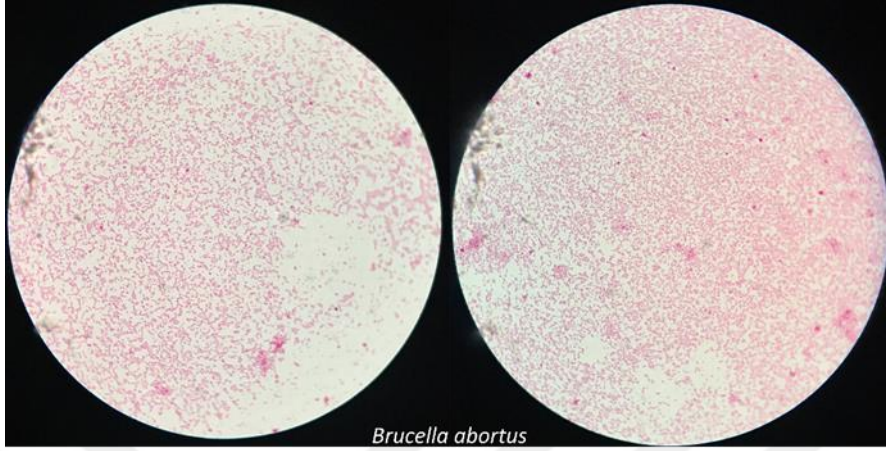
4.6.2 CO₂ İhtiyacı

B. abortus üreyebilmek için ilk izolasyonda %5-10 CO₂’li atmosfere ihtiyaç gösterir. *B. abortus* ilk izolasyonda gayet yavaş üreme gösterirken bir sonraki pasajlarda ise aerop etüvde üreme gösterir [68]. Kanlı agar ortamında 37 °C’de 48-72 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloniler incelendi. %10 CO₂ varlığında gelişen koloni morfolojilerinden *Brucella abortus* smooth morfolojisine sahip olan koloniler seçilerek gram boyama ve biyokimyasal testler ile *Brucella abortus* olduğu doğrulandı.

4.6.3 Gram Boyama Sonuçları

Dalakların kanlı agar ortamına ekimi gerçekleştirilip inkübasyona bırakıldıktan sonra *Brucella abortus*’a benzeyen yaklaşık 2 mm çapında, yuvarlak, saydam, hemolizsiz, pigmentsiz smooth kolonilerden seçilerek biyokimyasal testler ve gram boyama yapıldı. Bu amaçla kanlı agardaki taze bakteri kolonilerinden öze yardımıyla preparat hazırlandı ve bir dizi işlemin ardından ışık mikroskopunda Şekil 4.14’te görülen gram negatif (-) bir bakteri olan *Brucella*’nın pembe renkteki kokobasil görüntüleri elde edilmiştir. Gram boyama sonrası mikroskopta

gözlemlenen *B. abortus* 'un Şekil 4.14'deki gibi kokobasil şeklindeki Gr(-) olması literatürde belirtilen çalışmalarla benzer olup *Brucella abortus* olduğunu göstermektedir [120, 122-125].

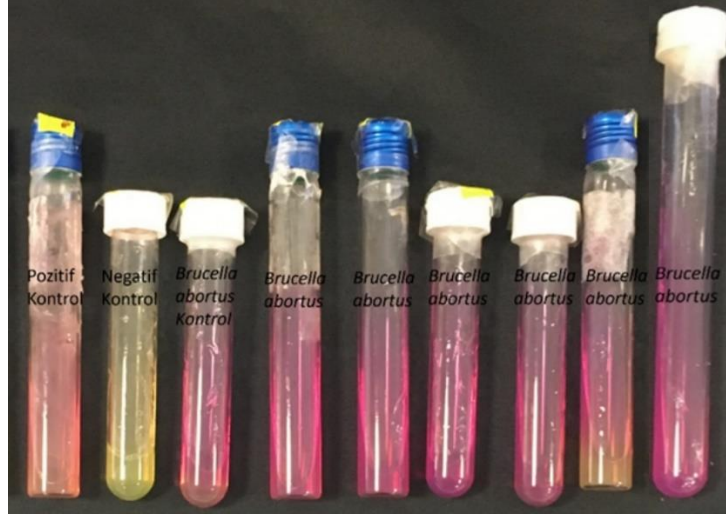


Şekil 4.14 *Brucella abortus* gram boyama sonucu ışık mikroskopundaki görüntüsü

4.6.4 Biyokimyasal Test Sonuçları

Üreaz Testi

Üreaz, üreyi NH_3 ve CO_2 'ye hidrolize eder. İlk iki saat içerisinde üreaz pozitif sonuç gösteren *B. abortus* bakterileri için üreaz testinin sonuçları ayırt edici özellik taşımaktadır [68]. İlk iki saat içerisinde pozitif sonuç göstermesine rağmen 24 saat reaksiyon gözlemlenir. Bu çalışmada da üreli agar ortamına ekimleri gerçekleştirilen bakterilerden pembe renk oluşturan kolonilerin bulunduğu cam tüpler pozitif sonuç olarak değerlendirildi. Negatif kontrol olarak *E.coli*, pozitif kontrol olarak *Klebsiella pneumoniae* seçildi. Petriden seçilen şüpheli kolonilere üreaz testi yapıldı. Üreaz aktivitesi gösteren *Brucella abortus* kolonileri pembe renk göstererek pozitif olarak sonuçlandı (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Üreaz test sonucu renk değişimleri

Oksidaz Testi

Oksidaz testinde bakterilerde oksidaz enziminin (sitokrom c) varlığı arandı. Aerobik bakterilerde oksidaz reaksiyonu, sitokrom oksidaz sisteminin var olduğunu gösterir. Oksidaz pozitif olan *B. abortus* bakterisi, mavi mor renk değişimleri gözlemlendiğinde ayırt edildi. Bu amaçla filtre kağıdına emdirilmiş olan oksidaz reaktifinden yararlanıldı.

Katalaz Testi

Sıklıkla aerob bakterilerde bulunan, *B. abortus* bakterisinde de mevcut olan katalaz enzimin varlığı hidrojen peroksit ile arandı [68]. Hidrojen peroksiti (H_2O_2), su (H_2O) ve oksijene (O_2) parçalarken rol alan katalaz enzimi bu noktada da bakterinin tanımlanmasında kullanıldı. Reaksiyonda hidrojen peroksit katılmasından sonra kabarcık oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirildi. Şüpheli durumlarda daha iyi gözlem yapılabilmesi adına mikroskop altında inceleme gerçekleştirildi.

Tablo 4.2 Biyokimyasal test sonuçları

Grup	Koloni Sayısı	Katalaz	Oksidaz	Üreaz	Smooth	CO ₂ ihtiyacı	Gram (-)/(+)
1	1310	+	+	+	+	+	Gr (-)

Tablo 4.2 Biyokimyasal test sonuçları (devamı)

2	20	+	+	+	+	+	Gr (-)
3	80	+	+	+	+	+	Gr (-)
4	410	+	+	+	+	+	Gr (-)
5	80	+	+	+	+	+	Gr (-)
6	110	+	+	+	+	+	Gr (-)
7	570	+	+	+	+	+	Gr (-)

Üreaz test sonuçları Şekil 4.2’de gösterilmiş olup, oksidaz ve katalaz test sonuçlarının da pozitif olması literatürde gerçekleştirilen çalışmalar ile uyumludur. Bu çalışmalarda üreaz, oksidaz, katalaz pozitif olan *B. abortus* bakterisi üzerinde yapılan çalışmalar mevcut sonuçları doğrulamaktadır [126]. Fare dalaklarında *Brucella* bakterisinin aranması ile ilgili olarak, *Brucella*’nın kanlı agar ortamında hemoliz oluşturmadığı sonucunun elde edilmiş olması literatürle benzerlik göstermektedir [127-131]. Tablo 4.2’de *Brucella abortus* olduğu net bir şekilde belirlenen kolonilerin koloni sayısı, katalaz, oksidaz, üreaz aktiviteleri ve morfolojisi, CO₂ ihtiyacı, gram boyama sonuçları toplu bir şekilde gösterilmiştir. Gram boyama sonuçlarında mevcut gram (-) *Brucella abortus* bakterisinin pembe renkli kokobasil görünümü, kanlı agar üzerindeki koloni morfolojilerinin smooth görüntülenmesi, CO₂ ihtiyacının öze yardımıyla izole edilmiş olan bakterilerde pozitif analiz edilmesi, üzerinde araştırma yapılan kolonilerin *Brucella abortus* bakterisine ait olduğunu doğrulamaktadır.

TARTIŞMA

Elde edilmiş olan sonuçlar analiz edildiğinde in vitro çalışmalardan MTT sonuçlarında görülmektedir ki 2, 4, 16 µg/ml konsantrasyonları hem EipB ve Omp25 proteinleri hem de nanoformülasyonları için RAW 264.7 makrofaj hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki bırakmamıştır. Ancak 64 ve 128 µg/ml konsantrasyonları Omp25 proteininde kullanıldığında makrofaj hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki bıraktığı görülmüştür. EipB proteininde ise yalnızca 128 µg/ml konsantrasyonu sitotoksik olarak etki bırakmıştır. Bu sebepten Omp25 proteini ve nanoformülasyonu için 16 µg/ml konsantrasyonu, EipB proteini ve

nanoformülasyonu için 64 µg/ml konsantrasyonunun kullanılması daha uygun görülmüştür. Nanopartiküler sistemler yalnızca rekombinant protein içeren formülasyonlarla kıyaslandığında NO seviyeleri daha yüksek gözlenmiştir. NO seviyeleri bağışıklık sisteminde makrofajların indüklendiğinin bir göstergesi olarak değerlendirildiğinden bu durum PLGA polimeri ile enkapsülasyon yapılmasının rekombinant proteinlerin immün sistemi indüklemeye potansiyelini arttırdığı yani immüностimulan etkinliği olumlu yönde etkilediği sonucunu vermiştir [132]. Belirlenen gruplar in vivo çalışmalarda kullanıldıktan sonra alınan ilk in vivo sonuçlardan olan IgG antikor yanıtında ise kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış görülene kadar (4. enjeksiyon) devam ettirilmiş ve 4. enjeksiyonun akabinde hem nanoformülasyonların hem de serbest haldeki rekombinant proteinlerin antikor yanıtındaki artış netleştirilmiş olup hümmoral yanıtın indüklendiği analiz edilmiştir. Antikor yanıtları incelendiğinde serbest haldeki proteinlerin kombine formülasyonunda daha az antikor yanıtı oluşturulmuşken nanoformülasyonların kombine grubunda daha fazla antikor yanıtı oluşturulmuştur. Bu durum PLGA ile nanopartiküler sistem elde edilmiş olmasının antikor yanıtı için kombine gruplarda olumlu etki oluşturduğunu göstermektedir. Antikor seviyesinde anlamlı düzeyde artış görüldükten sonra sakrifikasyonu gerçekleştirilmiş olan farelerin dalaklarındaki sitokin tayini sonuçları incelendiğinde, IFN-γ ve TNF-α sitokinlerinde kombine gruplardaki miktarların diğer gruplara göre daha yüksek olduğu, kontrol grubuna göre artış gösterdiği görülmüştür. IL-12 sitokini de kontrol grubuna göre hem nanopartiküler sistemlerin olduğu hem de serbest halde proteinlerin olduğu gruplarda artış göstermiştir. IFN-γ, TNF-α ve IL-12 değerlerindeki bu artış subunit aşılarda hedeflendiği gibi Th1 yanıtının indüklendiğini göstermiştir. Literatürdeki çalışmalarda da IFN-γ ve TNF-α değerleri yüksek çıkarken bağışıklık sisteminin Th2 yönündeki ilerlemesini işaret eden IL-4 değeri nispeten daha düşük çıkmaktadır [17]. Bu çalışmada da IL-4 sitokin değeri diğer sonuçlara göre daha düşük elde edilmiştir. Th2 yönünde bağışıklığın indüklenmesi olan IL4 sitokin değeri düşük çıkarken Th1 yönünde indüklenmenin habercisi olan sitokinlerin daha yüksek elde edilmesi mevcut formülasyonların hüccresel bağışıklığı daha fazla indüklediğini göstermektedir [133].

Elde edilmiş olan dalakların kanlı agardaki incelemelerine bakıldığında ilk olarak mevcut kolonilerin biyokimyasal testleri de içeren analizlerle *Brucella abortus* olduğu doğrulanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla en iyi sonuçta 1/65 kata kadar daha az koloni sayısı görülmüşken en düşük sonuçta dahi koloni sayısı %50'den fazla azalmıştır. Bu durum da mevcut formülasyonların bakteri üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğunu doğrulamaktadır. Koloni sayılarında nanopartiküler sistemleri içeren gruplarda daha fazla sayıda koloni gözlemlenmiş olması IFN- γ ve TNF- α sitokin sonuçları ile paralel seyretmiştir. Bütün bu sonuçlar göz önüne alındığında immün sistemin Th1 yanıtındaki bu artış ve nanoformülasyonların kontrollü salımı sebebiyle uzun vadede diğer gruplara göre daha etkin bir sonuç göstereceği öngörüldüğünden mevcut formülasyonların subunit aşı adayı olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

- [1] P. Głowacka, D. Żakowska, K. Naylor, M. Niemcewicz, and A. Bielawska-Drózd, "Brucella - Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment," (in eng), *Pol J Microbiol*, vol. 67, no. 2, pp. 151-161, 2018.
- [2] P. de Figueiredo, T. A. Ficht, A. Rice-Ficht, C. A. Rossetti, and L. G. Adams, "Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of Brucella-host interactions," (in eng), *Am J Pathol*, vol. 185, no. 6, pp. 1505-17, 2015.
- [3] S. K. Khurana *et al.*, "Bovine brucellosis - a comprehensive review," (in eng), *Vet Q*, vol. 41, no. 1, pp. 61-88, 2021.
- [4] J. Rajendhran, "Genomic insights into Brucella," (in eng), *Infect Genet Evol*, vol. 87, p. 104635, 2021.
- [5] A. S. Dean, L. Crump, H. Greter, E. Schelling, and J. Zinsstag, "Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency," (in eng), *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 6, no. 10, p. e1865, 2012.
- [6] A. A. Yıldırım and Y. Çetinkol, "Investigation of Brucellosis Seroprevalence in Ordu City: Five-Years Review," *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, vol. 4, no. 2, pp. 129-133, 2020.
- [7] S. Mızrakçı, E. K. Dindar Demiray, and H. Ötürk Akyüz, "Bruselloz Konulu Yayınların Global Analizi ve Türkiye'den Yapılan Yayınlarla Karşılaştırılması," *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, vol. 5, no. 3, pp. 229-235, 2021.
- [8] F. F. Tuon, R. B. Gondolfo, and N. Cerchiari, "Human-to-human transmission of Brucella - a systematic review," (in eng), *Trop Med Int Health*, vol. 22, no. 5, pp. 539-546, 2017.
- [9] S. A. Çeviker, Ö. Günal, H. T. Elmaslar-Mert, and E. Köksal, "Brucella Septic Arthritis and Abscess in Hand Joint," *Klinik Journal*, vol. 33, no. 2, pp. 185-187, 2020.
- [10] R. Mitra, "Treatment of Brucellosis," in *Updates on Brucellosis*, B. Manal Mohammad, Ed. Rijeka: IntechOpen, 2015, p. Ch. 11.
- [11] P. Julián Solís García del and S. Javier, "Treatment of Human Brucellosis — Review of Evidence from Clinical Trials," in *Updates on Brucellosis*, B. Manal Mohammad, Ed. Rijeka: IntechOpen, 2015, p. Ch. 12.
- [12] J. A. Smith *et al.*, "Brucella Induces an Unfolded Protein Response via TcpB That Supports Intracellular Replication in Macrophages," *PLOS Pathogens*, vol. 9, no. 12, p. e1003785, 2013.
- [13] N. Naghdi, H. Hassanzad-Azar, and A. Delpisheh, "The most important medicinal plants for treatment of brucellosis," vol. 1, no. 2, pp. e20-, %J J Prev Epidemiol 2016.

- [14] J. Lalsiamthara and J. H. Lee, "Development and trial of vaccines against Brucella," (in eng), *J Vet Sci*, vol. 18, no. S1, pp. 281-290, 2017.
- [15] X. Yang, J. A. Skyberg, L. Cao, B. Clapp, T. Thornburg, and D. W. Pascual, "Progress in Brucella vaccine development," (in eng), *Front Biol (Beijing)*, vol. 8, no. 1, pp. 60-77, 2013.
- [16] G. G. Schurig, R. M. Roop, 2nd, T. Bagchi, S. Boyle, D. Buhrman, and N. Sriranganathan, "Biological properties of RB51; a stable rough strain of Brucella abortus," (in eng), *Vet Microbiol*, vol. 28, no. 2, pp. 171-88, 1991.
- [17] Y. Mohammadi, "Evaluation of the immunogenicity and efficacy of a chimeric OMP25-OMP31 antigen in BALB/c mice," (in eng), *Vet Med Sci*, vol. 7, no. 5, pp. 2008-2014, 2021.
- [18] J. Zhang *et al.*, "A novel Omp25-binding peptide screened by phage display can inhibit Brucella abortus 2308 infection in vitro and in vivo," (in eng), *J Med Microbiol*, vol. 63, no. Pt 6, pp. 780-787, 2014.
- [19] S. Yousefi, M. Tahmoorespur, and M. H. Sekhavati, "Cloning, expression and molecular analysis of Iranian Brucella melitensis Omp25 gene for designing a subunit vaccine," (in eng), *Res Pharm Sci*, vol. 11, no. 5, pp. 412-418, 2016.
- [20] H. Zhu *et al.*, "Alterations of microRNAs and their predicted targeting mRNAs expression in RAW264.7 macrophages infected with Omp25 mutant Brucella melitensis," (in eng), *Innate Immun*, vol. 24, no. 6, pp. 382-389, 2018.
- [21] J. Herrou *et al.*, "Brucella Periplasmic Protein EipB Is a Molecular Determinant of Cell Envelope Integrity and Virulence," (in eng), *J Bacteriol*, vol. 201, no. 12, 2019.
- [22] D. Goel, V. Rajendran, P. C. Ghosh, and R. Bhatnagar, "Cell mediated immune response after challenge in Omp25 liposome immunized mice contributes to protection against virulent Brucella abortus 544," (in eng), *Vaccine*, vol. 31, no. 8, pp. 1231-7, 2013.
- [23] A. Jo *et al.*, "Fabrication and characterization of PLGA nanoparticles encapsulating large CRISPR-Cas9 plasmid," *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 18, no. 1, p. 16, 2020.
- [24] B. Bang, "The Etiology of Epizootic Abortion," *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, vol. 10, pp. 125-IN2, 1897.
- [25] D. J. Vassallo, "The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps," (in eng), *J R Army Med Corps*, vol. 138, no. 3, pp. 140-50, 1992.
- [26] A. Çayakar, "Bruselloz ve Tulareminin Tarihsel Yolculukları," *Aegean J Med Sci*, vol. 2, pp. 83-87, 2018.
- [27] J. Godfroid *et al.*, "From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis," (in eng), *Vet Res*, vol. 36, no. 3, pp. 313-26, 2005.

- [28] M. N. Seleem, S. M. Boyle, and N. Sriranganathan, "Brucellosis: a re-emerging zoonosis," (in eng), *Vet Microbiol*, vol. 140, no. 3-4, pp. 392-8, 2010.
- [29] (2022). *Brucella abortus*.
- [30] Z. Aras, M. Ateş, and U. S. Uçan, "Identification and Biotyping of Brucella Strains," *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, vol. 25, no. 1, pp. 51-59, 2009.
- [31] A. T. Cengiz and G. İ. J. A. Ü. T. F. M. DOLAPÇI, "BRUCELLA'LARIN ÖZELLİKLERİ VE BRUSELLOZDA TANI YÖNTEMLERİ," vol. 50, no. 1, 1997.
- [32] C. A. Rossetti *et al.*, "Systems biology analysis of Brucella infected Peyer's patch reveals rapid invasion with modest transient perturbations of the host transcriptome," vol. 8, no. 12, p. e81719, 2013.
- [33] P. de Figueiredo, T. A. Ficht, A. Rice-Ficht, C. A. Rossetti, and L. G. Adams, "Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis: Review of Brucella–Host Interactions," *The American Journal of Pathology*, vol. 185, no. 6, pp. 1505-1517, 2015.
- [34] L. G. J. V. m. Adams, "The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the Brucella genome," vol. 90, no. 1-4, pp. 553-561, 2002.
- [35] E. I. Castañeda-Roldán *et al.*, "Adherence of Brucella to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues," vol. 6, no. 5, pp. 435-445, 2004.
- [36] E. Barquero-Calvo *et al.*, "Brucella abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection," vol. 2, no. 7, p. e631, 2007.
- [37] S. C. Oliveira, F. S. de Oliveira, G. C. Macedo, L. A. de Almeida, N. B. J. M. Carvalho, and Infection, "The role of innate immune receptors in the control of Brucella abortus infection: toll-like receptors and beyond," vol. 10, no. 9, pp. 1005-1009, 2008.
- [38] E. Billard, J. Dornand, A. J. I. Gross, and immunity, "Brucella suis prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion," vol. 75, no. 10, pp. 4980-4989, 2007.
- [39] M. V. Delpino, C. A. Fossati, P. C. J. I. Baldi, and immunity, "Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with Brucella spp," vol. 77, no. 3, pp. 984-995, 2009.
- [40] A. V. Carvalho Neta *et al.*, "Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by Brucella abortus," vol. 76, no. 5, pp. 1897-1907, 2008.
- [41] G. E. Gabriela, V. A. Gorvel, S. Mémet, and J. P. Gorvel, "Brucella: Reservoirs and Niches in Animals and Humans," *Pathogens*, vol. 10, no. 2, p. 186, 2021.

- [42] S. Öncel, "BRUCELLA INFECTIONS: ASSESSMENT AND MANAGEMENT," *Journal of Health Sciences of Kocaeli University*, vol. 2, no. 3, pp. 25-30, 2016.
- [43] G. G. Alton and J. R. L. Forsyth, "Brucella. In: B, editor," in *Medical Microbiology*, B. S, Ed. 4 ed. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- [44] J. J. Lee *et al.*, "Phellinus baumii extract influences pathogenesis of Brucella abortus in phagocyte by disrupting the phagocytic and intracellular trafficking pathway," (in eng), *J Appl Microbiol*, vol. 114, no. 2, pp. 329-38, 2013.
- [45] J. P. Gorvel and E. Moreno, "Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication," (in eng), *Vet Microbiol*, vol. 90, no. 1-4, pp. 281-97, 2002.
- [46] A. Miyoshi *et al.*, "The role of the vacB gene in the pathogenesis of Brucella abortus," (in eng), *Microbes Infect*, vol. 9, no. 3, pp. 375-81, Mar 2007.
- [47] S. Christopher, B. L. Umapathy, and K. L. Ravikumar, "Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis," (in eng), *J Lab Physicians*, vol. 2, no. 2, pp. 55-60, 2010.
- [48] N. Lapaque, I. Moriyon, E. Moreno, and J. P. Gorvel, "Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor," (in eng), *Curr Opin Microbiol*, vol. 8, no. 1, pp. 60-6, 2005.
- [49] M. J. Corbel, "Brucellosis: an overview," (in eng), *Emerg Infect Dis*, vol. 3, no. 2, pp. 213-21, Apr-Jun 1997.
- [50] M. N. Seleem, S. M. Boyle, and N. Sriranganathan, "Brucella: a pathogen without classic virulence genes," (in eng), *Vet Microbiol*, vol. 129, no. 1-2, pp. 1-14, 2008.
- [51] J. M. Gee *et al.*, "The Brucella abortus Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice," (in eng), *Infect Immun*, vol. 73, no. 5, pp. 2873-80, 2005.
- [52] X. Dong *et al.*, "Construction and potential application of bacterial superoxide dismutase expressed in Bacillus subtilis against mycotoxins," *PLOS ONE*, vol. 16, p. e0260047, 2021.
- [53] J. M. Gee *et al.*, "Role of catalase in the virulence of Brucella melitensis in pregnant goats," (in eng), *Vet Microbiol*, vol. 102, no. 1-2, pp. 111-5, 2004.
- [54] B. Arellano-Reynoso *et al.*, "Cyclic beta-1,2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 6, no. 6, pp. 618-25, 2005.
- [55] F. J. Sangari, A. Seoane, M. C. Rodríguez, J. Agüero, and J. M. García Lobo, "Characterization of the urease operon of Brucella abortus and assessment of its role in virulence of the bacterium," (in eng), *Infect Immun*, vol. 75, no. 2, pp. 774-80, 2007.

- [56] S. Loisel-Meyer, M. P. Jiménez de Bagüés, S. Köhler, J. P. Liautard, and V. Jubier-Maurin, "Differential use of the two high-oxygen-affinity terminal oxidases of *Brucella suis* for in vitro and intramacrophagic multiplication," (in eng), *Infect Immun*, vol. 73, no. 11, pp. 7768-71, 2005.
- [57] J. P. Lavigne *et al.*, "Identification of a new virulence factor, BvfA, in *Brucella suis*," (in eng), *Infect Immun*, vol. 73, no. 9, pp. 5524-9, 2005.
- [58] X. Yang *et al.*, "Evaluation of Reactivity of Monoclonal Antibodies Against Omp25 of *Brucella* spp," (in eng), *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 10, p. 145, 2020.
- [59] C. Martínez-Núñez, P. Altamirano-Silva, F. Alvarado-Guillén, E. Moreno, C. Guzmán-Verri, and E. Chaves-Olarte, "The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*," (in eng), *J Bacteriol*, vol. 192, no. 21, pp. 5603-8, 2010.
- [60] L. Manterola *et al.*, "BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence," (in eng), *Infect Immun*, vol. 75, no. 10, pp. 4867-74, 2007.
- [61] G. Pappas, P. Papadimitriou, N. Akritidis, L. Christou, and E. V. Tsianos, "The new global map of human brucellosis," (in eng), *Lancet Infect Dis*, vol. 6, no. 2, pp. 91-9, 2006.
- [62] C. M. Cossaboom *et al.*, "Notes from the Field: *Brucella abortus* Vaccine Strain RB51 Infection and Exposures Associated with Raw Milk Consumption - Wise County, Texas, 2017," (in eng), *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, vol. 67, no. 9, p. 286, 2018.
- [63] K. A. Franc, R. C. Krecek, B. N. Häsler, and A. M. Arenas-Gamboa, "Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action," (in eng), *BMC Public Health*, vol. 18, no. 1, p. 125, 2018.
- [64] M. Dadar *et al.*, "Molecular identification of *Brucella* species and biovars associated with animal and human infection in Iran," (in eng), *Vet Res Forum*, vol. 10, no. 4, pp. 315-321, 2019.
- [65] G. Garofolo *et al.*, "Origins and global context of *Brucella abortus* in Italy," (in eng), *BMC Microbiol*, vol. 17, no. 1, p. 28, 2017.
- [66] M. Yilma, G. Mamo, and B. Mammo, "Review on Brucellosis Sero-prevalence and Ecology in Livestock and Human Population of Ethiopia," *Achievements in the Life Sciences*, vol. 10, no. 1, pp. 80-86, 2016.
- [67] B. H. Özer, "MILK AND MILK PRODUCTS | Microbiology of Liquid Milk," in *Encyclopedia of Food Microbiology*, R. K. Robinson, Ed. Oxford: Elsevier, 1999, pp. 1436-1441.
- [68] A. İlban, "Bruselloz tanısı konulmuş hastalardan izole edilen brucella suşlarının pır yöntemi ile sınıflandırılması " Yüksek Lisans, Mikrobiyoloji (Veterinerlik) Ana Bilim Dalı, Selçuk Üniversitesi 2016.
- [69] F. J. U. Ü. V. F. D. Taşçı, "Gıda kaynaklı brucellosis ve önemi," vol. 23, pp. 1-2, 2004.

- [70] N. Gürler, "Brusellozda Bakteriyolojik Tanı Yöntemleri," *Klimik Journal*, vol. 1, pp. 21-22, 1990.
- [71] G. Pappas, N. Akritidis, M. Bosilkovski, and E. Tsianos, "Brucellosis," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 352, no. 22, pp. 2325-36, 2005.
- [72] M. M. Madkour, "Osteoarticular Brucellosis," in *Madkour's Brucellosis*, M. M. Madkour, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001, pp. 74-84.
- [73] N. Akritidis, M. Tzivras, I. Delladetsima, S. Stefanaki, H. M. Moutsopoulos, and G. Pappas, "The liver in brucellosis," (in eng), *Clin Gastroenterol Hepatol*, vol. 5, no. 9, pp. 1109-12, 2007.
- [74] B. G. Mantur, S. K. Amarnath, and R. S. Shinde, "Review of clinical and laboratory features of human brucellosis," (in eng), *Indian J Med Microbiol*, vol. 25, no. 3, pp. 188-202, 2007.
- [75] M. P. Franco, M. Mulder, R. H. Gilman, and H. L. Smits, "Human brucellosis," (in eng), *Lancet Infect Dis*, vol. 7, no. 12, pp. 775-86, 2007.
- [76] P. Yagupsky, "Pediatric brucellosis: an (almost) forgotten disease," (in eng), *Adv Exp Med Biol*, vol. 719, pp. 123-32, 2011.
- [77] G. K. Sungur, D. Hazirolan, Y. Gurbuz, N. Unlu, S. Duran, and S. Duman, "Ocular involvement in brucellosis," (in eng), *Can J Ophthalmol*, vol. 44, no. 5, pp. 598-601, 2009.
- [78] P. C. Baldi and G. H. Giambartolomei, "Immunopathology of Brucella infection," (in eng), *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, vol. 8, no. 1, pp. 18-26, 2013.
- [79] M. Sisirak and M. Hukić, "Evaluation and importance of selected microbiological methods in the diagnosis of human brucellosis," (in eng), *Bosn J Basic Med Sci*, vol. 9, no. 3, pp. 198-203, 2009.
- [80] B. G. Mantur *et al.*, "Comparison of a novel immunocapture assay with standard serological methods in the diagnosis of brucellosis," (in eng), *Clin Lab*, vol. 57, no. 5-6, pp. 333-41, 2011.
- [81] Z. A. Memish, M. Almuneef, M. W. Mah, L. A. Qassem, and A. O. Osoba, "Comparison of the Brucella Standard Agglutination Test with the ELISA IgG and IgM in patients with Brucella bacteremia," (in eng), *Diagn Microbiol Infect Dis*, vol. 44, no. 2, pp. 129-32, 2002.
- [82] M. W. Al-Sous, S. Bohlega, M. Z. Al-Kawi, J. Alwatban, and D. R. McLean, "Neurobrucellosis: clinical and neuroimaging correlation," (in eng), *AJNR Am J Neuroradiol*, vol. 25, no. 3, pp. 395-401, 2004.
- [83] J. Solera, "Update on brucellosis: therapeutic challenges," (in eng), *Int J Antimicrob Agents*, vol. 36 Suppl 1, pp. S18-20, 2010.
- [84] R. Yousefi-Nooraie, S. Mortaz-Hejri, M. Mehrani, and P. Sadeghipour, "Antibiotics for treating human brucellosis," (in eng), *Cochrane Database Syst Rev*, vol. 10, no. 10, p. Cd007179, 2012.

- [85] J. Solera *et al.*, "A randomized, double-blind study to assess the optimal duration of doxycycline treatment for human brucellosis," (in eng), *Clin Infect Dis*, vol. 39, no. 12, pp. 1776-82, 2004.
- [86] K. Skalsky, D. Yahav, J. Bishara, S. Pitlik, L. Leibovici, and M. Paul, "Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials," (in eng), *Bmj*, vol. 336, no. 7646, pp. 701-4, 2008.
- [87] M. Y. Khan, M. W. Mah, and Z. A. Memish, "Brucellosis in pregnant women," (in eng), *Clin Infect Dis*, vol. 32, no. 8, pp. 1172-7, Apr 15 2001.
- [88] J. A. Al-Tawfiq, "Therapeutic options for human brucellosis," (in eng), *Expert Rev Anti Infect Ther*, vol. 6, no. 1, pp. 109-20, 2008.
- [89] I. Chopra, P. M. Hawkey, and M. Hinton, "Tetracyclines, molecular and clinical aspects," (in eng), *J Antimicrob Chemother*, vol. 29, no. 3, pp. 245-77, 1992.
- [90] D. Schnappinger and W. Hillen, "Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms," (in eng), *Arch Microbiol*, vol. 165, no. 6, pp. 359-69, 1996.
- [91] H. Nikaido and D. G. Thanassi, "Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples," (in eng), *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 37, no. 7, pp. 1393-9, 1993.
- [92] S. Levy and L. Bryan, "Antimicrobial Drug Resistance," ed: Academic Press, 1984.
- [93] C. Levine, H. Hiasa, and K. J. Mariani, "DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities," (in eng), *Biochim Biophys Acta*, vol. 1400, no. 1-3, pp. 29-43, 1998.
- [94] J. J. F. i. a. r. a. t. S. B. L. Vila, "Fluoroquinolone resistance," pp. 41-52, 2005.
- [95] H. Hiasa and M. E. Shea, "DNA gyrase-mediated wrapping of the DNA strand is required for the replication fork arrest by the DNA gyrase-quinolone-DNA ternary complex," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 275, no. 44, pp. 34780-6, 2000.
- [96] R. F. Eyler and K. Shvets, "Clinical Pharmacology of Antibiotics," (in eng), *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 14, no. 7, pp. 1080-1090, 2019.
- [97] T. R. Kemnic and M. Coleman, "Trimethoprim Sulfamethoxazole," in *StatPearls* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- [98] J. Lubroth, M. M. Rweyemamu, G. Viljoen, A. Diallo, B. Dungu, and W. Amanfu, "Veterinary vaccines and their use in developing countries," (in eng), *Rev Sci Tech*, vol. 26, no. 1, pp. 179-201, 2007.
- [99] Z. I. Goodwin and D. W. Pascual, "Brucellosis vaccines for livestock," (in eng), *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 181, pp. 51-58, 2016.

- [100] I. Moriyón *et al.*, "Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status," (in eng), *Vet Res*, vol. 35, no. 1, pp. 1-38, 2004.
- [101] J. McGiven *et al.*, "Improved serodiagnosis of bovine brucellosis by novel synthetic oligosaccharide antigens representing the capping m epitope elements of Brucella O-polysaccharide," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 53, no. 4, pp. 1204-10, 2015.
- [102] A. K. Jain, M. Das, N. K. Swarnakar, and S. Jain, "Engineered PLGA nanoparticles: an emerging delivery tool in cancer therapeutics," (in eng), *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, vol. 28, no. 1, pp. 1-45, 2011.
- [103] D. Singh, V. K. Somani, S. Aggarwal, and R. Bhatnagar, "PLGA (85:15) nanoparticle based delivery of rL7/L12 ribosomal protein in mice protects against Brucella abortus 544 infection: A promising alternate to traditional adjuvants," (in eng), *Mol Immunol*, vol. 68, no. 2 Pt A, pp. 272-9, 2015.
- [104] M. Ihlamur, "Production of polyclonal antibodies based on hybridoma technology against breast cancer cell line AU-565," Master of Science, Bioengineering, Yildiz Technical University, Istanbul, Turkey, 2021.
- [105] S. Dinparvar, "Development characterization of polycaprolactone based nanoparticulate carrier systems and in vitro investigation of their efficacy on breast cancer stem cells," Master of Science, Bioengineering, Yildiz Technical University, Istanbul/Turkey, 2018.
- [106] İ. Akmayan, "Biosynthesis of calcium-based nanoparticles by using bacteria and determination of their use areas," Master of Science, Nanoscience and Nanoengineering, Ataturk University, Erzurum, Turkey, 2015.
- [107] D. B. Burr and M. Hooser, "Alterations to the en bloc basic fuchsin staining protocol for the demonstration of microdamage produced in vivo," (in eng), *Bone*, vol. 17, no. 4, pp. 431-3, 1995.
- [108] J. L. Muñoz de Nova *et al.*, "Efficacy and safety of preoperative preparation with Lugol's iodine solution in euthyroid patients with Graves' disease (LIGRADIS Trial): Study protocol for a multicenter randomized trial," (in eng), *Contemp Clin Trials Commun*, vol. 22, p. 100806, 2021.
- [109] S. H. Lim *et al.*, "Bacterial culture detection and identification in blood agar plates with an optoelectronic nose," (in eng), *Analyst*, vol. 141, no. 3, pp. 918-25, 2016.
- [110] B. Shah, P. M. Davidson, and Q. Zhong, "Antimicrobial activity of nanodispersed thymol in tryptic soy broth," (in eng), *J Food Prot*, vol. 76, no. 3, pp. 440-7, 2013.
- [111] M. J. I. J. o. S. Corbel and E. Microbiology, "International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Brucella: Report of the Meeting, 5 September 1986, Manchester, England," vol. 38, no. 4, pp. 450-452, 1988.
- [112] T. Atabay *et al.*, "In Vitro Evaluation of Immunogenicity of Recombinant OMP25 Protein Obtained from Endemic Brucella abortus Biovar 3 as

- Vaccine Candidate Molecule Against Animal Brucellosis," (in eng), *Protein Pept Lett*, vol. 28, no. 10, pp. 1138-1147, 2021.
- [113] Abamor E. Ş. *et al.*, "Evaluation of in vitro and in vivo immunostimulatory activities of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with soluble and autoclaved *Leishmania infantum* antigens: A novel vaccine candidate against visceral leishmaniasis," *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE*, vol. 12, no. 8, pp. 353-364, 2019.
 - [114] H. Afshari, M. Maleki, and M. Salouti, "Immunological effects of two new nanovaccines against *Brucella* based on OPS and LPS antigens conjugated with PLGA nanoparticles," *European Polymer Journal*, vol. 139, p. 110021, 2020.
 - [115] O. A. Tosyali *et al.*, "Nano-co-delivery of lipophosphoglycan with soluble and autoclaved leishmania antigens into PLGA nanoparticles: Evaluation of in vitro and in vivo immunostimulatory effects against visceral leishmaniasis," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 120, p. 111684, 2021.
 - [116] S. Yousefi, T. Abbassi-Dalooi, M. H. Sekhavati, and M. Tahmoorespur, "Evaluation of immune responses induced by polymeric OMP25-BLS *Brucella* antigen," (in eng), *Microb Pathog*, vol. 115, pp. 50-56, 2018.
 - [117] N. Tripathi and A. Sapra, *Gram Staining*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2022.
 - [118] M. Aboksour, "VIRULENCE GENES DETECTION IN BRUCELLA ISOLATED FROM ANIMALS FARMS IN WEST OF IRAQ," *Biochemical and Cellular Archives*, vol. 18, pp. 59-64, 2021.
 - [119] F. A. Al-Dhabaan, "Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 26, no. 6, pp. 1247-1252, 2019.
 - [120] A. Dominguez-Flores *et al.*, "*Brucella abortus* induces mast cell activation through TLR-2 and TLR-4," (in eng), *Microb Pathog*, vol. 176, p. 106005, 2023.
 - [121] H. Bodur *et al.*, "Biotypes and antimicrobial susceptibilities of *Brucella* isolates," (in eng), *Scand J Infect Dis*, vol. 35, no. 5, pp. 337-8, 2003.
 - [122] A. Elizalde-Bielsa *et al.*, "Development and evaluation of the *Galleria mellonella* (greater wax moth) infection model to study *Brucella* host-pathogen interaction," (in eng), *Microb Pathog*, vol. 174, p. 105930, 2023.
 - [123] J. M. García Lobo, Y. Ortiz, C. Gonzalez-Riancho, A. Seoane, B. Arellano-Reynoso, and F. J. Sangari, "Polymorphisms in *Brucella* Carbonic Anhydrase II Mediate CO₂ Dependence and Fitness in vivo," (in English), *Original Research* vol. 10, 2019.
 - [124] R. M. Roop, 2nd, D. Preston-Moore, T. Bagchi, and G. G. Schurig, "Rapid identification of smooth *Brucella* species with a monoclonal antibody," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 25, no. 11, pp. 2090-3, 1987.

- [125] N. M. A. Waringa *et al.*, "Human brucellosis in Baringo County, Kenya: Evaluating the diagnostic kits used and identifying infecting *Brucella* species," *PLOS ONE*, vol. 18, no. 1, p. e0269831, 2023.
- [126] T. Ica, F. Aydin, S. Erdenlig, L. Guler, and E. Büyükcangaz, "Characterisation of *Brucella abortus* biovar 3 isolates from Turkey as biovar 3b," (in eng), *Vet Rec*, vol. 163, no. 22, pp. 659-61, 2008.
- [127] G. Foster, K. L. Jahans, R. J. Reid, and H. M. Ross, "Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter," (in eng), *Vet Rec*, vol. 138, no. 24, pp. 583-6, 1996.
- [128] M. A. Geresu, G. Ameni, A. Wubete, Á. M. Arenas-Gamboa, and G. M. Kassa, "Isolation and Identification of *Brucella* Species from Dairy Cattle by Biochemical Tests: The First Report from Ethiopia. *World Vet. J.* 6(2): 80-88," 2016.
- [129] P. Gupta, A. Anil, P. Ray, S. Rana, and A. Angrup, "Brucellosis in pyrexia of unknown origin: Reminiscing the forgotten entity," *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2022.
- [130] S.-G. Kim, Y.-H. Kim, M.-H. Cho, Y.-J. Lee, and C.-K. J. K. J. o. V. S. Park, "Biochemical characteristics of *Brucella abortus* isolated from cattle in Gyungbuk Province," vol. 32, no. 2, pp. 139-146, 2009.
- [131] A. Raj, V. Gautam, P. K. Gupta, S. Sethi, S. Rana, and P. Ray, "Rapid detection of *Brucella* by an automated blood culture system at a tertiary care hospital of north India," (in eng), *Indian J Med Res*, vol. 139, no. 5, pp. 776-8, 2014.
- [132] S. Segura, C. Gamazo, J. M. Irache, and S. Espuelas, "Gamma interferon loaded onto albumin nanoparticles: in vitro and in vivo activities against *Brucella abortus*," (in eng), *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 51, no. 4, pp. 1310-4, 2007.
- [133] M. Clausse *et al.*, "The vaccine candidate BLSOmp31 protects mice against *Brucella canis* infection," *Vaccine*, vol. 31, no. 51, pp. 6129-6135, 2013.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. S. Öztav, İ. Akmayan, İ. Çoksu, S.A. Derman, T.Ö. Arasoğlu, E.Ş. Abamor, “Bruselloz’a Karşı Antijen Yüklü Polimer Temelli Nanopartiküler Aşı Adaylarının Geliştirilmesi”, INSAC International Researches Congress on Natural and Engineering Sciences (INSAC-IRNES'23), Konya, 2023.

Projeler

1. T. Özbek, "Brusellozis hastalığına karşı rekombinant antijenik proteinlerini içeren nanoformülasyonların eldesi ve in vitro/in vivo değerlendirilmesi ", YTÜ BAPK, FBA-2022-4648, 2022-2023.

Ödüller

1. TÜBİTAK Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı (2210/C)