



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANA BİLİM DALI**

**KOYUNLARIN LİSTERİAL ENSEFALİTİSİNDE HÜCRESEL
BAĞIŞIKLIK YANIT İLE HMGB1 PROTEİN İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

Neslihan AKBULUT TOSUN

Danışman
Prof. Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR

SAMSUN
2021

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANA BİLİM DALI**



**KOYUNLARIN LİSTERİAL ENSEFALİTİSİNDE HÜCRESEL
BAĞIŞIKLIK YANIT İLE HMGB1 PROTEİN İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

Neslihan AKBULUT TOSUN

Danışman

Prof. Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR

Bu tez TAGEM/HSGYAD/A/18/A5/P1/719 proje numarası ile TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) tarafından desteklenmiştir.

SAMSUN
2021

TEZ KABUL VE ONAYI

Neslihan AKBULUT TOSUN tarafından, Prof. Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR danışmanlığında hazırlanan “Koyunların Listerial Ensefalitisinde Hücresel Bağışıklık Yanıt ile HMGB1 Protein İlişkisinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 29.7.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan (Danışman)	Prof. Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul
	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul
	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Nihat TOPLU		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul
	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Oğuz KUL		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul
	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/> Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Gökhan İNAT		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul
	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Dönem Projesi tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

İmza

06 /07/ 2021

Neslihan AKBULUT TOSUN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : Koyunların Listerial Ensefalitisinde Hücresel Bağışıklık Yanıt İle Hmgbl Protein İlişkisinin Belirlenmesi

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 06/07/2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 5

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

İmza

06 /07 / 2021

Prof. Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR

ÖZET

KOYUNLARIN LİSTERİAL ENSEFALİTİSİNDE HÜCRESEL BAĞIŞIKLIK YANIT İLE HMGB1 PROTEİN İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ Neslihan AKBULUT TOSUN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Veterinerlik Patolojisi Ana Bilim Dalı
Doktora, Temmuz/2021
Danışman: Prof. Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR

Listeriozis, insan ve hayvanlarda ölüme neden olması ve çok yaygın olarak görülmesi nedeni ile mücadele edilmesi gereken önemli bir hastalıktır. Hastalık hayvanlarda yavru atmaya, merkezi sinir sistemi lezyonlarına ve septisemiye neden olup, ileriki safhalarda ölümle sonuçlanan hastalık tablosu oluşturabilmektedir. Koyunlarda listeriozisin ensefalitis (rombensefalitis) formunda lezyonların özellikleri ve salınan sitokinler az sayıdaki çalışmayla gösterilmiştir. Bununla birlikte doku hasarının patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. HMGB1 (High mobility group box 1) proteini, MSS dahil birçok organda yangısal dejeneratif lezyonların oluşmasında rol alan bir alarmandır. Bu çalışma ile koyunlarda listerik ensefalitisteki lezyonların oluşum sürecinde, HMGB1'in rolü hakkında daha ayrıntılı bilgi edinilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, doğal olarak şekillenen listerik ensefalitisli 15 adet koyuna ait arşivsel parafin bloklar kullanıldı. Beş adet normal koyuna ait beyin dokusu ise kontrol doku olarak incelendi. Dokulardan hazırlanan kesitler hematoksilen-eozin ile boyanarak, lezyonlar süresine göre değerlendirildi. Beynin rombensefalon bölgesine ait kesitlerde bakterinin varlığı immunohistokimyasal (IHC) olarak gösterildi. Aynı metotla yapılan boyamalarda rombensefalon bölgesinde nöron, endotel hücreleri, makrofaj ve nötrofilde HMGB1 proteinin subselüler yerleşimi ve yoğunluğu değerlendirildi. Bu kesitlerde HMGB1'in ekspresyonu, oligodentrosit, astrosit ve mikroglia hücre belirteçleri ile ikili immunofloresan teknikle incelendi.

HMGB1 ekspresyonu en yoğun nöron, oligodentrosit, makrofaj ve mikroglia da görülmüştür. Akut olgularda oligodentrositlerden, subakut ve kronik olgularda mikroglia da HMGB1 salınımının daha fazla olduğu saptanmıştır. Lezyon süresine göre yapılan değerlendirmede akut olgularda hücre çekirdek ve sitoplazmalarında yoğun immunpozitiflik varken, subakut ve kronik olgularda bu hücrelerdeki reaktivitesi azalmıştır.

Listerial ensefalitiste şekillenen lezyonların oluşum sürecinde katkısı bulunan hücrelerde HMGB1'in eksprese edildiği görüldü. HMGB1'in yangısal süreçlere katkıda bulunduğu ve hastalığın patogenezisinde rol aldığı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Alarminler, ensefalitis, HMGB1, koyun, listeriozis

ABSTRACT

THE CHARACTERIZATION OF ASSOCIATION OF CELLULAR IMMUNE RESPONSE AND HMGB1 PROTEIN IN OVINE LISTERIAL ENCEPHALITIS

Neslihan AKBULUT TOSUN

Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Veterinary Pathology
PhD, 2021

Supervisor: Prof. Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR

Listeriosis is an important disease that needs to be struggled because it causes death in humans and animals and its widespread appearance. The disease can cause abortion, central nervous system lesions and septicemia leading to death in later stages in animals. In addition, listeriosis can cause large economic losses in sheep breeders resulting in abortion and deaths. The characteristics of the lesions and the released cytokines in the form of listeric encephalitis (rhombencephalitis) in sheep have been demonstrated by a small number of studies. However, the pathogenesis of tissue damage has not yet been fully elucidated. HMGB1 protein is an alarmin that plays a role in the formation of inflammatory degenerative lesions in many organs, including the central nervous system (CNS). In the study, it was aimed to obtain more detailed information about the role of HMGB1 in the formation process of the lesions in listeric encephalitis in sheep.

Archival paraffin blocks belonging to 15 sheep with naturally occurring listeric encephalitis were used in the study. Brain tissues from 5 normal sheep served as control tissue. Sections prepared from tissues were stained with hematoxylin-eosin and evaluated according to the duration of the lesions. The presence of the bacteria in sections of the rhombencephalon region of the brain has been demonstrated immunohistochemically (IHC). The subcellular localization and density of HMGB1 protein in the neuron, endothelial cells, macrophage (mikroglia) and neutrophil in the rhombencephalon region were evaluated with the same method. Expression of HMGB1 in these sections was examined by dual immunofluorescence technique with oligodendrocyte, astrocyte and microglia cell markers.

HMGB1 expression was most densely seen in neurons, oligodendrocytes, macrophages and microglia. HMGB1 release was higher in oligodendrocytes in acute cases and in microglia in chronic and subacute cases. In the evaluation made according to the duration of the lesion, there was intense immunity in the cell nuclei and cytoplasm in acute cases, while the reactivity in the cells decreased in subacute and chronic cases. It was observed that HMGB1 was expressed in the cells that contributed to the formation process of the lesions shaped in listerial encephalitis.

It is thought that HMGB1 is contribute to inflammatory processes and play a role in the pathogenesis of the listerial encephalitis.

Keywords: Alarmins, encephalitis, HMGB1, sheep. listeriosis.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile beni yetistiren ve her zaman bana destek olan danışman hocam sayın Prof. Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR'a, bilgi ve becerilerini bana aktaran hocalarım sayın Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ, Prof. Dr. Mahmut SÖZMEN, Prof. Dr. Murat YARIM ve sayın Doç. Dr. Yonca Betil KABAK'a, Dr.Öğr. Üyesi Mehmet Fatih Bozkurt'a, OMÜ Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Elemanlarına,

Tezimin gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne,

Sabrı ve anlayışıyla her aşamamda yanımda olan canım oğluma, eşime ve sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Neslihan AKBULUT TOSUN

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	İİİ
ABSTRACT	İV
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR	Vİİİ
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	Xİİ
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Listeriozis ve Bağışıklık Yanıtın Tarihçesi	3
2.2. Etiyoloji	6
2.3. Epizootiyoloji	8
2.4. Virülans Faktörleri ve Patogenez	10
2.5. Bulgular	14
2.6. Listerial Ensefalitis (Rombensefalitis) ve Hücresel Bağışıklık Yanıt.....	18
2.7. Listerial Enfeksiyona Karşı Konakçı Hücre Yanıtı.....	19
2.7.1. Doğal Bağışıklık Yanıtı	19
2.7.2. Kazanılmış bağışıklık yanıtları	22
2.7.3. Epitel Hücre İnvazyonu ile İlişkili Sinyal İletim Yolları.....	24
2.7.4. Makrofajlarda NF-kB'nin Aktivasyonu ve Konak Gen İfadesinin Modülasyonu	24
2.7.5. Endotel Hücrelerinin Enfeksiyonu Sırasında Konakçı Yanıtları.....	24
2.8. Doğal bağışıklıkta tanıma molekülleri (Alarminler).....	25
2.9. HMGB1 (High Mobility Group Box-1)	26
2.9.1. MSS'nin gelişiminde ve hastalıklarında HMGB1 proteinin rolü	29
2.10. RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products).....	30
3. MATERYAL VE METOT.....	32
3.1. Materyal.....	32
3.2. Metot	32
3.2.1. Histopatolojik İnceleme	32
3.2.2. İmmunohistokimyasal İnceleme	33
3.3. İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Analizi.....	36
3.4. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR.....	38

4.1. Histopatolojik Bulgular	38
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	41
4.2.1. Listeria Antijeninin İmmunohistokimyasal Dağılımı	41
4.2.2. HMGB1	45
4.2.3. İkili immunfloresan boyama sonuçları	50
5. TARTIŞMA.....	57
6. SONUÇ	68
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ.....	90

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
ABC	Avidin-biotin peroksidaz kompleks
AEC	3-amino-9-etilkarbazol
Apaf	Apoptotik peptidaz aktivatör faktör
APES	3-aminopropiltrioksolan
Ark	Arkadaşları
BSA	Sığır Serum Albumin
C°	Santigrad derece
CFU	A colony-forming unit
cm	Santimetre
CSF-1	The colony stimulating factor 1
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahidroklorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DC	Dentritik Hücre
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
ER	Endoplazmik retikulum
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HE	Hematoksilen ve eozin
HMGB1	High mobility group box 1
IFNγ	İnterferon gama
IL	İnterlökin
LM	Listeria monositogenes
LRR	The leucine-rich repeats
MCP-1	The monocyte chemoattractant protein-1
MET	Mezenkimal-Epitel Geçiş
ml	Mililitre
MSS	Merkezi Sinir Sistemi

NACHT NAIP, CIITA, HET-E ve TEP1 içeren protein alanı

NALP Nacht, leucine rich repeat and pyrin domain containing

NET Neutrophil extracellular trap

NFκB Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells

NK hücre Natural Killer (Doğal Katil) hücre

NLR Nod-like receptor

NOD The nucleotide-binding oligomerization domain

OLİG2 Oligodendrosit transkripsiyon faktörü

OMÜ Ondokuz Mayıs Üniversitesi

PBS Fosfatlı tampon solüsyonu (Phosphate buffer saline)

pH Asit ve alkali yoğunluğunun göstergesi

PI3K Fosfatidilinositol 3-kinaz

PV Perivasküler

RAGE Receptor for Advanced Glycosylation End Products (Gelişmiş Glikasyon Son Ürünleri için Reseptör)

SABPK Streptavidin Biotin Peroksidaz Kompleks

Th1 T helper hücre 1

TLR Tool Like Reseptör

TNFα Tumor Necrosis Factor Alpha

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Listeria'nın virülans faktörleri ve patogenezi. (1) Listeria'nın reseptörlerine bağlanması. (2) İnvazyon. (3) Fagositik vakuol organizmayı içeriye taşır. (4) Listeria, LLO dahil çeşitli mekanizmalarla vakuolden kaçır. (5) Listeria, LLO, Flagellin ve InlC dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla konakçı bağışıklığından kurtulur. (6) Aktin kuyruğu oluşumu organizmayı bir hücreden diğerine iter. (7) Son olarak, organizmanın salınması (Dhama vd., 2015).	11
Şekil 2.2. Hayvanlarda ve insanlarda listeriyozun bulaşması ve klinik bulguları (Dhama, vd., 2015).	17
Şekil 2.3. HMGB1 protein yapısının şeması (Ugrinova ve Pasheva, 2017).	27
Şekil 4.1. Perivasküler manşet kalınlığının lezyon süresine göre değerlendirilmesi, 39	
Şekil 4.2. Nötrofillerin yoğun olduğu akut lezyon mikroapse alanı, Rombensefalon, koyun, HxE.	40
Şekil 4.3. Nötrofil ve mononükleer lökositlerin birlikte bulunduğu subakut lezyon, mikroapse alanı, Rombensefalon, koyun, HxE.	40
Şekil 4.4. Makrofajların baskın olduğu kronik lezyon, mikroapse alanı, Rombensefalon, koyun, HxE.	41
Şekil 4.5. Akut bir lezyonda nötrofillerin sitoplazmalarında ya da hücre dışı yerleşimli, nokta veya kısa çubuk şekilli, immunopozitif Listeria antijeni, rombensefalon, koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.	42
Şekil 4.6. Subakut lezyonda, genellikle makrofajların sitoplazmalarında ya da hücre dışı yerleşimli Listeria immunopozitif etkenler (oklar), rombensefalon, koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.	42
Şekil 4.7. a: Kronik lezyonda şiddetli Listeria immunopozitif reaksiyon (oklar). b: Kronik lezyonda hafif immunopozitif reaksiyon, rombensefalon, koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.	43
Şekil 4.8. Subependimal bölgede bazı makrofajların sitoplazmalarında listerial antijen için granüler tarzda immunopozitif reaksiyon (oklar), Rombensefalon bölgesi (olgu no 3), koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.	43
Şekil 4.9. a: Koroid pleksus epitelinde ve makrofajlarda Listeria immunopozitif reaksiyonlar (oklar), b: Nöronda nokta şeklinde Listeria immunopozitif reaksiyonlar, Rombensefalon bölgesi, koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.	44
Şekil 4.10. Listeria immunopozitifliği, Mikroapse alanında hafif şiddetli (a) veya yoğun (b), immunopozitiflik varken perivasküler hücrelerde antijen immunopozitif hücre bulunmamaktadır. c: perivasküler hücrelerde hafif şiddette immunreaksiyon, d: subakut granülatöz bir odakta antijen negatif immunreaksiyon, rombensefalon, koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.	45
Şekil 4.11. Listeria pozitif olgularda immunohistokimya sonuçlarına göre HMGB1 yoğunluğunun semikantitatif değerlendirmesi. (* = P<0,05; ** = P<0,0001).	46
Şekil 4.12. Kronik bir mikroapse lezyonu içerisinde makrofajlarda nükleer, sitoplazmik ve ekstraselüler yerleşimli, şiddetli HMGB1 immunreaktivitesi, Rombensefalon, koyun SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.	47
Şekil 4.13. Akut ve subakut mikroapse alanında HMGB1 immunreaktivitesi, a: Akut bir mikroapsede nötrofillerde orta şiddette immunreaktivite, b: Akut mikroapsede nötrofillerde nükleer ve sitoplazmik immunopozitif reaksiyon, c: Subakut mikroapsede nükleer, sitoplazmik ve ekstraselüler alanda immunopozitif reaksiyon,	

rombensefalon, koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.....	48
Şekil 4.14. Perivasküler hücrelerde HMGB1 immunreaktivitesi. a: kronik olguda yoğun perivasküler sitoplazmik ve nüklear immunopozitiflik, b: Subakut bir olguda birkaç immunopozitif perivasküler mononüklear hücre. rombensefalon bölgesi, koyun, SABPK metod/AEC, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.....	48
Şekil 4.15. Kontrol ve Listeria pozitif grupların HMGB1 immunopozitiflik skorlaması	49
Şekil 4.16. a: Kontrol beyin dokusunda nöronda HMGB1 için hafif immunoreaksiyon, b: Akut bir olguda HMGB1 için nöronal sitoplazmik ve glial hücrelerde yoğun sitoplazmik ve nüklear immunoreaksiyon. Rombensefalon bölgesi, koyun, , SABPK metod/AEC, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.	49
Şekil 4.17. Endotel hücrelerinde immunreaktivite, a: Akut olguda HMGB1 için endotel hücrelerinde şiddetli sitoplazmik ve nüklear immunopozitiflik (ok) yanında bazı endotel hücrelerinde negatif immunreaksiyon (okbaşı), b: Listeria negatif kontrol dokuda bazı endotel hücrelerinde hafif nüklear immunopozitif (ok) ve immunonegatif reaksiyon (okbaşı), rombensefalon bölgesi, koyun, SABPK metod/AEC, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.....	50
Şekil 4.18. Hücre belirteçleriyle yapılan ikili immunfloresan boyama analizine göre HMGB1 ekspresyonu	52
Şekil 4.19. Oligodentrositlerde HMGB1 ekspresyonu (ok), a: Olig2 ekspresyonu, FITC, b: HMGB1 ekspresyonu, Rodamin, c: DAPI çekirdek boyası, d: Birleştirilmiş (merged), Olig2+ hücrede HMGB1 immunreaktivitesi. Rombensefalon, koyun (olgu 12), ikili immunfloresan yöntem.....	52
Şekil 4.20. Kontrol dokuda oligodentrositlerde HMGB1 ekspresyonu, a: Olig2 immunopozitif hücre (ok), FITC, b: Aynı alanda HMGB1 immunopozitif hücre (ok), Rodamin. c: a ve b ile aynı hücrede DAPI çekirdek boyası (ok), e: Birleştirilmiş (merged), Olig2+ hücrede HMGB1 immunreaktivitesi. Rombensefalon, koyun, ikili immunfloresan yöntem.....	53
Şekil 4.21. Akut bir olguda, mikroglia hücrelerinde HMGB1 ekspresyonu (ok), a: CD11b ekspresyonu, FITC, b: HMGB1 ekspresyonu, Rodamin, c: DAPI çekirdek boyası, d: Birleştirilmiş (merged), CD11b pozitif hücrede HMGB1 immunreaktivitesi. Rombensefalon, koyun, ikili immunfloresan yöntem	54
Şekil 4.22. Astrositlerde HMGB1 ekspresyonu (ok), a: Aynı hücrelerde GFAP pozitif astrositler, FITC. b: HMGB1 için çoğunlukla nüklear boyanma, rodamin c: DAPI çekirdek boyaması, d: Birleştirilmiş fotoğraf (merged), astrositlerde nüklear HMGB1 immunreaktivitesi (ok), Rombensefalon, koyun, ikili immunfloresan yöntem.	55
Şekil 4.23. a: Kontrol dokuda, GFAP pozitif astrositler, FITC, b: Aynı alanda HMGB1 negatif immunreaksiyon, Rodamin c: çekirdek boyaması, DAPI, d: Birleştirilmiş fotoğraf (merged), Astrositlerde negatif HMGB1 immunreaksiyon (ok), Rombensefalon, koyun, ikili immunfloresan yöntem.....	56

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. İyi tanımlanmış alarminler, reseptörleri ve biyolojik rolleri (Nie vd., 2016)	25
Tablo 3.1. İmmunohistokimyasal (SABPK) boyamalarda kullanılan antikorlar ve özellikleri	34
Tablo 3.2. İkili İmmunfloresan boyamalarda kullanılan primer ve sekonder antikorlar ve özellikleri	35
Tablo 3.3. İmmunohistokimyasal sonuçların değerlendirilmesi	36
Tablo 4.1. Koyunlara ait listerik ensefalitis olgularının histopatolojik sınıflandırılması	38
Tablo 4.2. İkili immunfloresan boyamalarda HMGB1 yoğunluğunun hücreyel yerleşime göre skorlanması	51

1. GİRİŞ

Listeriozis, çevrede saprofit olarak yaşayan, ancak zaman zaman memeliler, keseli hayvanlar, kuşlar ve sürüngenler de dahil olmak üzere çok çeşitli omurgalılarda hastalık tablosu oluşturan, gram pozitif, hücre içi fakültatif bir bakteri olan çeşitli *Listeria* türlerinden kaynaklanır. Dünya çapında yüksek prevalansı olan, halk sağlığını ilgilendiren, atipik, gıda kaynaklı (food-born) önemli bir hastalıktır. Listeriozis, meningitis, septisemi ve abort yapması bakımından zaman zaman mortalitesi %20-30'lara çıkabilmektedir. Türkiye gibi özellikle küçükbaş hayvancılığı yoğun olan yerlerde *Listeria* enfeksiyonlarından ileri gelen kayıplar önemli bir yer tutmaktadır. Bu durumlara paralel olarak, *Listeria* cinsi etkenlerin yeni tekniklerle araştırılması bir gereksinim olarak ortaya çıkmaktadır.

Veteriner Hekimlikte listerial ensefalitis hemen hemen sadece ruminantlarda oluşmaktadır ve yeterince fermente olmamış ve pH'sı 5.5'in üzerindeki silajla yoğun beslenen hayvanlarda ve özellikle kış mevsiminde daha yüksek oranlarda görülmektedir (Dreyer vd., 2015; Low ve Donachie, 1997; Oevermann vd., 2010). Ensefalitik listeriozis, nöropatolojik araştırma verilerine göre bazı ülkelerde küçük ruminantların en önemli merkezi sinir sistemi hastalığı olarak gösterilmektedir (Oevermann vd., 2008). Bununla birlikte hastalığın doğal konakçılarında ensefalitik listeriozisin patolojisi ve patogenezisi hakkında bazı detaylı çalışmalar bulunmaktadır (Oevermann vd., 2008; Oevermann vd., 2010a; Oevermann vd., 2010b; Otter ve Blakemore, 1989; Pfister vd., 2002; Potel vd., 1969). *In vitro* ve *in vivo* veriler, bakterinin enfekte olmuş lökositler içinde kan-beyin veya kan-koroid bariyerleri üzerinden taşınarak veya serbest halde endotel hücrelerinden doğrudan invazyonu ile MSS'ne giriş potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Alternatif olarak bakterinin trigeminal sinirlerde aksonal transport aracılığı ile beyine ulaştığı ortaya konulmuştur. Bununla birlikte beyin lezyonlarının patogenezisi tam olarak aydınlatılamamıştır (Oevermann vd., 2010). Farelerde yapılan deneysel çalışmalar öncelikle MSS'ndeki sitokin üretimine odaklanmıştır (Hoge vd., 2013; Mielke vd., 1993; Nakane vd., 1999; Queiroz vd., 2000; Schluter vd., 1996).

Ruminantlarda listerioziste beyinde şekillenen bağışıklık yanıtında rol alan hücreler ile bazı sitokinlerin belirlenmesine ilişkin bazı detaylı çalışmalar mevcuttur (Abdlla vd., 2015; Di Palma vd., 2012; Krueger vd., 1995). Bununla birlikte immun sistem için erken uyarı sinyalleri olarak etki eden ve birçok hastalıkta doğal ve

kazanılmış bağışıklığın oluşmasında ve patojenlere karşı ilk olarak salınan alarmin adı verilen moleküllerle ilgili çalışmalara veteriner alanında çok sık rastlanmamaktadır.

Alarminlerin prototipi ve en çok çalışılanı hareketli grup proteinlerinden olan HMGB1 (High mobility group box-1)'dir. Lokalizasyonuna bağlı olarak farklı fonksiyonları olan bu protein, endojen veya eksojen uyarılar karşısında nukleus/sitoplazma/ekstrasellüler bölümleri arasında geçiş yaparak, ekstrasellüler boşluğa salındığında sitokin benzeri görev yapmaktadır (Andersson vd., 2014). HMGB1 sepsisin geç mediatörü olarak bilinir ve serumda artan HMGB1 düzeyleri kanser, sepsis ve otoimmunitenin prognozu ile korelasyon göstermektedir. İnsanlarda görülen romatoid artrit, septik şok, akut akciğer hasarı, kanser gibi birçok hastalıkta HMGB1 proteinin artan düzeyleri ile hastalıkların şiddeti arasında korelasyon olduğu çok çeşitli araştırmalarla ortaya konulmuştur (Andersson vd., 2018; Brown vd., 2009; Charoensup vd., 2014; Y. Chen vd., 2016; Grover vd., 2008; Janko vd., 2014; Johansson vd., 2014; Kamau vd., 2009; Rrapaj vd., 2018; Vénéreau vd., 2016; Y. Wang vd., 2019). Yangısal ve otoimmün hastalıklarda kanda ve dokularda artan seviyeleri HMGB1'in hastalıkların tanı ve tedavilerinde eşsiz bir hedef biyobelirteç olabileceği bildirilmektedir (Magna ve Pisetsky, 2014). Veteriner alanında oldukça sınırlı sayıda araştırma bulunmakla birlikte (Furukawa vd., 2011; Heinola vd., 2013; Ley vd., 2009; Miyasho vd., 2011; Sterenczak vd., 2011; Zhang vd., 2016), hayvanlardaki listerioziste buna yönelik çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılan çalışma ile koyun listerik ensefalitide beyinde oluşan yangısal infiltrasyonlar ile HMGB1 ekspresyonu arasındaki ilişki yanında, yangı süresince bu alarminin hangi hücre veya hücrelerde eksprese edildiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın, listerik ensefalitis yanında benzer diğer yangısal hastalıkların patogenezi ile teşhis ve tedavilerinde HMGB1'in rolüne ilişkin yapılacak diğer çalışmalara temel oluşturacağı düşünülmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Listeriozis ve Bağışıklık Yanıtın Tarihçesi

Günümüz araştırmacıları tarafından listerik enfeksiyon olduğu düşünülen hastalıktan ölen insanların dokularından, gram pozitif çomaklar gözlemlemiş olan iki araştırmacı, 1891 yılında Fransa’da Hayem ve 1893 yılında Almanya’da Henle hastalığa dair en eski kanıtları sunmuştur. 1911’de kayıtlara geçen ilk izolasyon ise, İsveçli bilim insanı Hülphers’in, organizma tanımı *L. monocytogenes*’e çok yakın olan *Bacillus hepatis* adını verdiği mikroorganizmadır (Gray ve Killinger, 1966). İzole ettiği bakteri ile sağlıklı hayvanları enfekte eden Murray vd. 1926’da, kobay ve tavşanların kanında monositlerin arttığını görerek mikroorganizmaya *Bacillus monocytogenes* ismini vermiştir. Atkinson (1917) tarafından bildirilen küçük menenjit salgını da muhtemelen bu bakteriden kaynaklandığını bildirmiştir. Matthews (1928), Almanya’da 1925’te koyunlarda, 1928’de sığırlarda, Listeriozis olduğu düşünülen, etiyojisi bilinmeyen bir ensefalitis salgını bildirmiştir. Çiftlik hayvanlarında *L.monocytogenes*’in ilk izolasyonu ile tanınan Gill (1937), 1929’da koyunlar arasında gözlemlediği bozukluğu "dönme hastalığı" olarak adlandırmıştır. Etkilenen hayvanların beyninden bakteriyi izole ederek onunla hastalık arasındaki ilişkiyi kurmakla birlikte, ancak altı yıl sonra bakterinin gerçek kimliğini belirleyebilmiştir. O zamandan beri, *L. monocytogenes* nedenli enfeksiyonlar yaygın olmakla birlikte, günümüzde sadece evcil hayvanların hastalıkları arasında ekonomik öneme sahip olmakla kalmayıp, aynı zamanda onlarla temas halinde olabilecek çok çeşitli yabani hayvanları, kuşları ve insanları da etkilediği bilinmektedir (Gray ve Killinger, 1966).

Listeria monocytogenes, enfeksiyon ve bağışıklığın temel yönlerini incelemek için bir model olarak 50 yıldan fazla süredir kullanılan, fakültatif hücre içi bir patojendir. *Listeria monocytogenes*, CD8⁺ Thücrelerinin güçlü bir indükleyicisi olmakla birlikte, CD8⁺ sitotoksik T hücreleri aracılığı ile uzun ömürlü hücresel bağışıklık gelişimini olumlu yönde etkilemesi bu bakteriyi hem bulaşıcı hastalık uygulamaları hem de kanser immünoterapisi için çekici bir aşı vektörü yapmaktadır. (Chávez-Arroyo ve Portnoy, 2020).

1911’de tavşanlarda karaciğer nekrozuna neden olan bir bakterinin ilk raporundan itibaren etkeni tanımaya yönelik araştırmalar yıllar içinde devam etmiştir. Bakteri 1962’de immünologlar için hücre aracılı bağışıklığın tanımlanmasını sağlayan

çok önemli bir araç haline gelmiştir (Mackaness, 1962). Hastalığın patogenezi ve enfeksiyona karşı immun yanıtın araştırıldığı çalışmalar 2000'li yıllardan sonra ivme kazanmıştır (Lebreton vd., 2016).

1990'larda, bağışıklık sisteminin nasıl etkinleştirildiğini açıklamak için, doğal ve kazanılmış bağışıklık tepkileri oluşturan iki popüler model geliştirilmiştir. Charles Janeway'ın önerdiği "kendiliğinden başlamayan enfeksiyöz" modelde, *patojenle ilişkili moleküler kalıpların (pathogen-associated molecular pattern=PAMP'ler)* (örneğin lipopolisakkaritler veya diğer mikrobiyal bileşenler) tanınmasıyla aktive edilen, profesyonel antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından, bağışıklık tepkilerinin başlatıldığı ileri sürülmüştür (Janeway, 1992). Bu model, patojen tanımayı, ortak uyarımı ve kendiliğinden veya kendiliğinden olmayan ayrımı yanında, bağışıklık yanıtın enfeksiyonlar tarafından nasıl başlatıldığını veya belirli mikrobiyal bileşenleri içeren adjuvanlar tarafından nasıl güçlendirildiğini de açıklamaktadır. Bu hipotez, Toll benzeri reseptörler (TLR) gibi *kalıp tanıma reseptörleri (pathogen recognition receptors=PRR)*'nin tanımlanması için de temel bir dayanak olmuştur (Medzhitov ve Janeway, 2000). Bununla birlikte, Janeway'ın modeli, otoimmün bozukluklarda, greft reddinde, alerji veya steril yangıda ortaya çıkan immün tepkileri kolayca açıklayamamaktadır (Yang vd., 2010). Buna karşın Polly Matzinger tarafından "alternatif tehlike modeli" önerilmiştir. Bu model ile bağışıklık yanıtın, patojenlere, toksinlere, mekanik hasara ve benzerlerine maruz kalan stresli veya hasarlı hücrelerden ve dokulardan kaynaklanan tehlike sinyalleri tarafından başlatıldığı öne sürülmüştür. Bu model, sadece patojen kaynaklı bağışıklık için değil, aynı zamanda mikroorganizmaların yokluğunda ortaya çıkan bağışıklık yanıtı için de akılcı açıklamalar sağlamaktadır. Bununla birlikte sonrasında tam olarak neyin "tehlike sinyalleri" olarak kabul edileceğine dair yeniden tanımlamalar yapılmıştır. Başlangıçta, ısı şok proteinleri (HSP) ve salındığında APC'leri aktive edebilen herhangi endojen bir molekülün tehlike sinyali olabileceği öne sürülmekteydi. Tehlike sinyalleri listesine daha sonra, IL-1, interferon, TNF, CD40 ligand, ATP, memeli DNA'sı, hücre dışı matrislerin bozulmuş ürünleri, haptenler, toksinler, ürik asitler ve hatta mikrobiyal bileşenler gibi hem endojen hem de eksojen parçalar eklenmiştir. (Gallucci ve Matzinger, 2001). 2004 yılında, PAMP'ler ve hasarlı dokudan türetilen tehlike sinyallerinin, ortak kimyasal hidrofobik özelliklerine ve bağışıklık sistemini uyarma işlevine dayalı olarak, tamamının hasara bağlı moleküler modeller (DAMP'ler)

olarak adlandırılmaları önerilmiştir (Seong ve Matzinger, 2004).

1990'ların sonlarında ve 2000'lerin başlarında, defensinler ve katelisidinler gibi bazı memeli antimikrobiyal peptitlerin ve proteinlerin (AMP), dendritik hücreler (DC'ler) ve makrofajlar gibi APC'lerin aktivasyonu ile kemotaktik göçü başlatan etkiye sahip oldukları belirlenmiştir (Biragyn vd., 2001; Yang vd., 2000; Yang vd., 1999). APC çekici etkiye $G_{i\alpha}$ -protein bağlı reseptörler (GiPCR'ler) aracılık ederken, , bazıları PRR olarak tanımlanan diğer reseptörlerin de APC'yi aktive eden etkiye aracılık ettiği ortaya konulmuştur (Biragyn vd., 2002; Yang vd., 2000; Yang vd., 2004; Yang vd., 1999). Bu tür AMP'lerin in vivo bir antijen ile birlikte uygulanması, DC'lerin toplanmasına ve edinilmiş immün yanıtların artmasına neden olduğu görülmüştür (Biragyn vd., 2002; Biragyn vd., 2001; Yang vd., 2004; Yang vd., 2003). Daha sonra, tüm AMP'lerin bu etkilere sahip olmadığı ortaya çıkmıştır. Öte yandan, yüksek hareketli grup kutu-1 proteini (HMGB1) gibi geleneksel olarak AMP olarak kabul edilmeyen bazı endojen araçların da DC'ler üzerinde benzer kemotaktik ve aktive edici etkiler sergilediği gösterilmiştir (Rovere-Querini vd., 2004;. Wang vd., 1999; Yang vd., 2010).

2004 yılına gelindiğinde, profesyonel APC olarak DC'lerin, dokularda toplanmaları ve olgunlaşmalarının, antijene özgü T hücre aktivasyonuna dayalı bağışıklık yanıtın başlatılması için çok önemli olduğu tespit edilmiştir (Banchereau ve Steinman, 1998). Bu nedenle, tehlike sinyallerine yanıt olarak periferik dokularda hızla mevcut hale gelen ve APC'lerin güçlenmesini ve olgunlaşmasını uyararak doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtları başlatabilen, yapısal olarak farklı endojen aracı moleküller önerilmiştir. Tehlikeye yanıt olarak üretildikleri ve bağışıklık sistemini alarma geçirdikleri için "*alarmin*" olarak adlandırılmışlardır (Oppenheim ve Yang, 2005; Yang ve Oppenheim, 2004; D. Yang vd., 2010). Hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMP'ler) ve alarminlerin sürekli değişen tanımlarını ortadan kaldırmak için Kasım 2019'da Japonya'da düzenlenen Uluslararası DAMP & Alarmins toplantısında daha yeni kriterler oluşturulmuştur (Mezzapelle vd., 2019). Bu kriterlere göre "Alarminler" hücre hasarı, hücre ölümü, stres veya enfeksiyon sebebiyle canlı hücreler tarafından salınan veya ifade edilen ve bağışıklık sisteminin aktivasyonunu tetikleyen bir endojen immünomodülatör moleküller sınıfı olarak kabul edilmektedir (Matta vd., 2017; Mezzapelle vd., 2019).

Alarminler, PAMP'lerin eşdeğeridir, ancak genellikle doğal bağışıklık sistemi

hücre yapılarında (örn. granüositler, epitel hücreleri ve keratinositler) granüllerin, sitoplazmanın veya çekirdeğin bileşenleri olarak depolanan endojen moleküllerdir. Alarminler programlanmamış hücre ölümünün ardından hızla salınırlar ancak apoptotik hücreler tarafından salınmazlar. Bağışıklık sistemi hücreleri genellikle özel salgılama sistemleri veya endoplazmik retikulum (ER)-Golgi salgılama yolu kullanılarak, ölmeden alarmin üretmeye ve salmaya teşvik edilebilir. Dendritik hücreler de dahil olmak üzere doğal bağışıklık sisteminin hücrelerini aktive ederler ve böylece doğrudan veya dolaylı olarak aynı zamanda kazanılmış bağışıklık tepkilerini de desteklerler. Son olarak, alarminler, hasarlı dokunun restorasyonunu destekleyerek homeostazı da geri sağlarlar (Mezzapelle vd., 2019).

Alarminler için tüm kriterlere örnek teşkil edecek özelliklere sahip molekül ise HMGB1'dir (Mezzapelle vd., 2019). HMG süper aile proteinleri, 30 yıldan daha uzun bir süre önce keşfedilen nükleozom bağlayıcı protein ailesinden oluşur (. Goodwin vd., 1973). Son on yılda çok sayıda çalışma, bazı HMG proteinlerinin hücre dışı olarak salınabildiğini ve farklı hücre dışı biyolojik aktiviteler sergilediğini ortaya koymuştur (Lotze vd., 2005; Bianchi 2007; Andersson vd., 2002; Straino vd., 2008; Palumbo vd., 2004). Enfeksiyon ve bağışıklıkta HMGB1'in rolünün keşfi, Wang vd. (1999)'nın ilk olarak HMGB1'in makrofajlar tarafından salındığını ve endotoksin kaynaklı septik şokun geç bir aracı olarak hareket ettiğini bildiren çalışmaları ile olmuştur. O zamandan beri, HMGB1'in çeşitli lökositler üzerinde birçok farklı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Kokkola vd.,2005; Andersson vd., 2000; Li vd., 2004; Rouhiainen vd., 2004; Yang vd., 2010).

2.2. Etiyoloji

Listeria genusu şu anda 2009'dan beri yeni tarif edilen 12 Listeria türü de dahil olmak üzere 20 türden oluşmaktadır; *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, ve *L. booriae*, *L. goaensis*, *L. thailandensis*, *L. costaricensis* (Leclercq vd., 2019).

Bunlar arasında majör patojen olan *L. monocytogenes*'in serotiplendirmesi, *L. monocytogenes* somatik (O) ile flagellar (H) antijenleri ile yapılmaktadır ve *L. monocytogenes* kendi içerisinde 14 farklı (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c,

4d, 4e, 7, 4h) serotipe ayrılmaktadır (Feng vd., 2020). *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* kaynaklı zaman zaman insan enfeksiyonları da bildirilmiştir (Allerberger, 2003). *Listeria ivanovii*, cinsin ikinci patojen türü olup, ruminantlara özgüdür (Ramaswamy vd., 2007). *L. ivanovii* 5 serovardan ve *L. innocua*, 6a ve 6b olmak üzere iki serotipten oluşmaktadır (Allerberger, 2003; Gasanov vd., 2005).

Listeria spp.'de antijenik kompozisyon ve patojenite arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. *L. ivanovii*'ye özgü serovar 5 neredeyse yalnızca geviş getiren hayvanlardan, özellikle koyunlardan izole edilmiştir. Bu hayvanlarda serovar 5 suşları perinatal enfeksiyonlardan sorumlu iken, ensefalitise neden olmadığı görülmüştür. *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2b ve 4b serovarı, insan ve hayvanlarda listeriozis olgularının % 90'ından fazlasını oluşturur. 1/2c gibi diğer serovarylar, genellikle gıda kontaminantları olarak tespit edilmiştir. Hastalığa ilişkin serovarylardan, 4b suşları dünya çapında listeriozis olgularının % 50'sinden fazlasına neden olur, ancak 1/2 suşları (1 / 2a, 1 / 2b ve 1 / 2c) gıda izolatlarında baskındır. Bu durum, serovar 4b suşlarının memeli konak dokulara serogrup 1/2 suşlarından daha fazla adapte olduğunu göstermektedir (Vázquez-Boland vd., 2001).

Listeria türleri, gram pozitif, fakültatif anaerobik, sporsuz, kapsülsüz, hareketli ve küçük çubuk şekilli, $0,4-0,5 \times 1-2$ µm ölçülerinde hücre içi bakterilerdir. *Listeria* türleri taze kültürlerde Gram-pozitif olmasına rağmen, eski kültürlerde kokoid ve uzun filamentli Gram-negatif görülebilmektedir. Kanlı agarda 24-48 saat aralığında 37°C'lik inkübasyondan sonra, *Listeria* türlerinin kolonileri yaklaşık 0,5-1 mm çaplarında (inkübasyon süresi ve koloni sayısının mesafesine bağlı olarak), gri beyaz renkte, saydam, düz, duruma göre sulu bir yapı göstermektedir. Beş ile 10 gün sonra bu bakteri kolonileri birbirinden iyi ayrılan, çapları 3 ile 5 mm arasında değişen şemsiye şeklindeki ve pürüzlü varyantlara dönüşürler. (Gray ve Killinger, 1966).

Listeria genomunun tanımlanması, o suşun patojenitesinin belirlenmesi yanında türler arasında ortak olan ya da türe özgü özelliklerin ortaya konulmasında yarar sağlamaktadır. *L. monocytogenes*'in genom yapısı toplamda 133 yüzey proteinlerinden oluşmaktadır. Genom'un kodlama kapasitesinin %5'lik kısmını yüzey proteinleri oluşturmaktadır. Buna ek olarak, hücre yüzeyi proteinlerini kodlayan genlerin %22'lik kısmının *L. innocua*'da bulunmadığı belirlenmiştir. Dolayısıyla, bu iki tür arasındaki temel farklılığın yüzey protein bileşenlerinden kaynakladığı saptanmıştır (Buchrieser, 2007; Cabanes vd., 2002). *L. monocytogenes*'in virülans

faktörünü kodlayan genin ekspresyonu, bir transkripsiyonel aktivatör, prfA (peptide chain release factor 1) geni tarafından düzenlenmektedir (Cabanes vd., 2002; de las Heras vd., 2011). *PrfA* aynı zamanda internalin ve LLO'nun transkripsiyonunu arttırıp, *prfA* geninde bulunan hızlandırıcıları da düzenlemektedir (Gray vd., 2006). *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'nin kümelediği virulans genleri aynı zamanda sırasıyla, phosphatidylinositol-specific phospholipase C ve phosphatidylcholine-dependent phospholipase C (PI-PLC)'yi kodlayan *plcA* ve *plcB* genlerini de barındırmaktadır. ActA (Aktin düzeneği indükleyen protein) geni ise aktinin yapısına katılmaktadır. (Schmid vd., 2005).

2.3. Epizootiyoloji

Listerialar doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Toprak, toz, hayvan yemi, su, kanalizasyon, yeşil bitki ve sebzeler, sağlıklı hayvan ve insanların gastrointestinal sistem florası, asemptomatik insanlar ve hayvanlar, dışkı, genital akıntı, burun akıntısı da dahil olmak üzere birçok evcil hayvandan da izole edilebilmiştir. 4 ° C'de saklanan işlenmiş gıda bile *Listeria*'yı barındırabilir (Bartt, 2000; MacGowan vd., 1994). *L. monocytogenes*'in minimum enfeksiyon dozu, gıdanın gramı başına en az 100 koloni oluşturan birim (CFU) olmasına rağmen, olası ciddi sonuçlar göz önüne alındığında, Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya ve Çin dahil olmak üzere birçok ülke, hazır gıdalarda *L. monocytogenes* için sıfır tolerans politikası uygulamaktadırlar (Feng vd., 2020).

Hammaddelerde bulunan *L. monocytogenes*, sütün pastörizasyonu gibi, çoğu işlenmiş gıdanın üretimi için tipik olan zaman-sıcaklık kombinasyonları tarafından etkin bir şekilde etkisiz hale getirilmesine rağmen; çiğ süt, tereyağı, yumuşak peynirler ve işlenmiş et ve kümes hayvanları ürünleri dahil olmak üzere birçok hayvandan elde edilen *L. monocytogenes* ile kontamine gıda ürünleri, insanlarda listeriosis vakaları ve salgınlarının kaynağı olarak gösterilmektedir. Enfekte hayvanlar ve kontamine tarım ortamları, nadiren doğrudan insan enfeksiyonlarına neden olur gibi görünse de, çiğ süttten yapılan peynir gibi tüketimden önce işlenmemiş hayvansal gıda ürünleri ve enfekte hayvanların dışkısıyla kontamine olmuş bitkisel kaynaklı çiğ gıdalar çiftlik hayvanlarında ve çiftlik ortamlarında *L. monocytogenes* ile insan enfeksiyonları doğrudan ilişkilidir (Nightingale vd., 2004). İnsanların da duyarlı olduğu ve genellikle sporadik olarak gözlenen Listeriosis'in hayvanlarla yakın temasta bulunan veteriner hekimler, veteriner sağlık teknisyenleri ve hayvan yetiştiricileri gibi bazı meslek

gruplarında yayılım gösterdiği tespit edilmiştir (Zelenik vd., 2014). Hastalığın gelişiminde Listerial antijenlere duyarlı bireyler, immun yetmezlik, intrauterin yaşam, ilaç bağımlılığı, yaşlılık, alkolizm, şeker hastalığı, AIDS, vb. durumlar hazırlayıcı faktör olarak etkilidirler (Jones, 1990). Özellikle ABD ve Avrupa birliği ülkelerinde insanlarda sporadik listeriosis olgusunda tavuk eti ve ürünlerinin enfeksiyonun yayılmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Hayvansal orjinli besin maddelerindeki listeriosis olguları veya epidemileri ile ilgili araştırmalar sonucu genel olarak *L. monocytogenes*'in kırmızı et ve et ürünlerindeki bulunma oranı %0-92, çiğ sütlerde %0-45, süt ürünlerinde %0-87, tavuk eti ve ürünlerinde %15-80 arasında bir değişim gösterir (Farber ve Peterkin, 1991). Listeriozis insanlarda ateşli gastroenteritis yanında, karaciğer ve dalak tutulumu ve enfeksiyöz mononükleozis benzeri lenfadenopatilere neden olabilmektedir. Ayrıca, önemli bir komplikasyon olarak merkezi sinir sistemi (MSS)'inde genellikle diffuz meningitis veya meningoensefalitis ya da bazen rombensefalitis şeklinde patolojik olarak koyunlardakine benzer lezyonlar oluşturabilmektedir (Bartt, 2000).

Hastalık yeterince fermente olmamış ve pH'sı 5.5'in üzerindeki silajla yoğun beslenen hayvanlarda ve özellikle kış mevsiminde daha yüksek oranlarda görülmektedir. Ruminantlardaki listerial enfeksiyonun silaj tüketimiyle ilişkili olması nedeniyle enfeksiyonlar "silaj hastalığı" olarak da bilinmektedir. Selüloz ihtivası fazla yemlerle beslenen hayvanlarda listerial enfeksiyonlara daha sık rastlanmaktadır (Gudding vd., 1989). Aniden silaja geçiş, iklim koşulları, yem değişiklikleri, yeşil yem eksikliği, gebelik, hastalık için yatkınlık faktörleridir. Enfekte ve asemptomatik taşıyıcı hayvanların dışkı, idrar, süt ve burun akıntısı ile abort yapan hayvanlardan aborte fötüs ve uterus akıntısı ile etken saçılımı olmaktadır. Bulaşma konjenital, sindirim, solunum ve veneral yolla olmaktadır (McLauchlin ve Low, 1994; Ryser ve Donnelly, 2015).

Bu hastalık özellikle ruminantlarda önemli olup, 3 ayrı hastalık veya sendrom olarak davranış göstermektedir. İyi bilinen bu sendromlar, abortla seyreden gebe uterusun enfeksiyonu, milier visseral apselerle karakterize septisemi ve ensefalitis sayılabilir. Ayrıca, ruminantlarda konjunktivitis, endokarditis ve mastitis oluşturan formları da bulunmaktadır (Cantile ve Youssef, 2016). Listeriozis'in teşhisi, etken izolasyonu yanında, patolojik olarak, beyin kökünde mikroapseler ve perivasküler hücre infiltrasyonu ile immunohistokimyasal olarak *L. monocytogenes*'in beyin

dokusunda gösterilmesine dayanmaktadır (Campero vd., 2002; Oevermann vd., 2008).

2.4. Virülans Faktörleri ve Patogenez

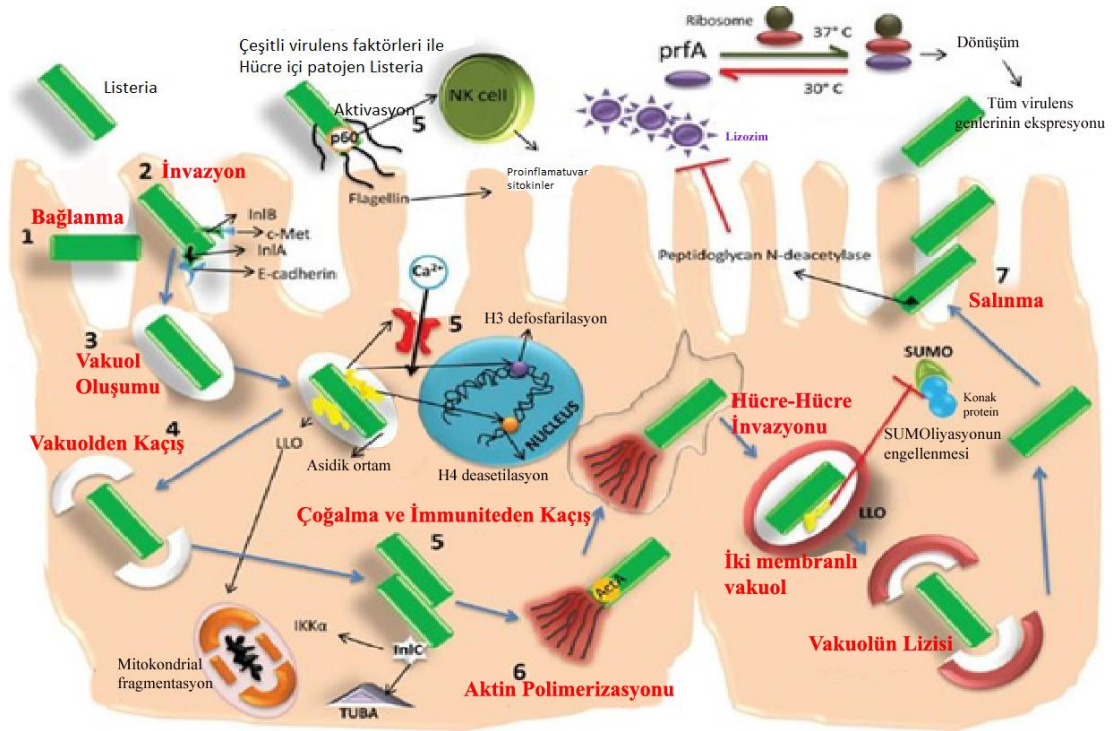
Listeriozisin patogenezisi ve etkenlerin virülansları, bakterilerin memeli hücrelerine penetre olmalarına, penetre oldukları hücrelerin mekanizmalarını kullanmalarına ve konakçı bağışıklık sistemini istila etmek için çok karmaşık stratejiler geliştirmelerine bağlıdır (Edelson ve Unanue, 2000; Torres vd., 2004). Etkenin virülansı, genoma dağılmış en az 50 gen tarafından belirlenmektedir. Bu hücre içi parazitizmin moleküler temeli büyük ölçüde açıklığa kavuşturulmuştur (Camejo vd., 2009; Toledo-Arana vd., 2009).

Hücre içine girişte rol oynayan internalin proteinler InlA ve InlB, por oluşturma aktivitesine sahip toksin listeriolysin O (LLO), iki fosfolipaz PlcA ve PlcB, ile bakteriyel yüzey proteini olan ActA, bakterinin majör virülans faktörleri olarak belirlenmiştir (Dussurget vd., 2004; Schnupf ve Portnoy, 2007). Bu virülans faktörleri bir transkripsiyon faktörü olan pozitif düzenleyici faktör A (PrfA)'nın kontrolü altında koordineli olarak ifade edilir (Lecuit, 2007; Dussurget vd., 2004). Bir memeli konakçının vücut ısısında (37°C) PrfA bağımlı virülans genleri *L. monocytogenes*'i çevresel bir bakteriden, hücre içi bir patojene dönüştürür (Bierne vd., 2007; Oevermann vd., 2010b; Johansson vd., 2002). Ortamda gereksiz ekspresyondan kaçınmak için, PrfA regulon, konakçı hücre enfeksiyonu sırasında seçici olarak aktive edilir. Hücre dışı ve hücre içi yaşam tarzları arasındaki geçişi gösteren bir dizi sinyal, çoğu durumda tam olarak anlaşılabilen farklı mekanizmalar yoluyla PrfA'ya iletilir (de las Heras vd., 2011).

L. monocytogenes çok çeşitli memeli hücrelerini istila edip, bunların içinde çoğalabilme yeteneğine sahiptir. Makrofajlar gibi fagositik hücreler söz konusu olduğunda, bakteri girişi fagositoz tarafından sağlanırken, endotel hücreleri, eritrositler ve fibroblastlar gibi fagositik olmayan hücrelere girişi bazı yüzey invazyon proteinleri aracılığı ile olmaktadır (Cossart, 2011; Ireton, 2007). Konakçı hücrelere giriş, internalinler, listerik yüzey ligandları ve bunların ilgili konak hücre reseptörleri arasındaki etkileşim ile yönetilir. Çok sayıda internalin ve internalin benzeri protein tanımlanmıştır. Internalin ailesi proteinleri InlA, InlB, InlC, InlJ, InlH ve InlK olarak tanımlanmıştır. Tüm bu internalin proteinler *Listeria*'nın virülansı ve patogenezinde farklı rollere sahiptir (Bierne vd., 2007). Internalinler arasında en çok çalışılan InlA ve InlB şimdiye kadar sadece *L. monocytogenes*'de tanımlanmıştır

(Dramsi vd., 1995; Gaillard vd., 1991; V'azquez-Boland vd., 2001).

İnternalin A ve B, hücreye invazyon için ana proteinlerdir. E-kaderin, bakterilerin membrana bağlı bir vakuolde hücre içine girmesine izin veren InlA için bir reseptör görevi görür ve bu etkileşim türe özgüdür. Çünkü murin E-kadherin, amino asit dizilerindeki varyasyon nedeniyle InlA'ya bağlanmaz (Mengaud vd., 1996; Smutny & Yap, 2010). İnsan listeria türlerinin % 90'ından fazlası InlA aracılı invazyona sahiptir (Jacquet vd., 2004). İnternalin B, kompleman sistemine dahil bileşen olan Clq'nun küresel kısmına ve MET reseptörüne bağlanır (Braun vd., 2007; Cossart, 2011; Dhama vd., 2015; Hamon, 2006). Bu iki internalinin dışında, invazyona dahil olan Vip, Auto, p60, GtcA ve MprF gibi başka proteinler de vardır (Camejo vd., 2011)



Şekil 2.1. Listeria'nın virülans faktörleri ve patogenezi. (1) Listeria'nın reseptörlerine bağlanması. (2) İnvazyon. (3) Fagositik vakuol organizmayı içeriye taşır. (4) Listeria, LLO dahil çeşitli mekanizmalarla vakuolden kaçır. (5) Listeria, LLO, Flagellin ve InlC dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla konakçı bağışıklığından kurtulur. (6) Aktin kuyruğu oluşumu organizmayı bir hücreden diğerine iter. (7) Son olarak, organizmanın salınması (Dhama vd., 2015).

Listeria monocytogenes tarafından üretilen ve koful zarına girerek gözeneklerin oluşumuna neden olan toksin, listeriolysin O (LLO) olarak adlandırılır. Bu gözenekten *L. monocytogenes*, lizozomal füzyondan önce fagozomdan kaçarak hücrenin sitoplazmasına girer ve böylece hücre içinde yıkılmaktan kurtulur (Schnupf ve

Portnoy, 2007).

Aktin birleşimini indükleyen protein (ActA), "aktin kuyrukları" oluşturmak için aktin polimerizasyonunu destekleyen başka bir yüzey proteindir. Aktin kuyrukları, *Listeria*'nın aktif olarak hareket etmesini ve doğrudan hücreden hücreye yayılmasını sağlar. Konakçı hücrenin sitoplazması içine girdikten sonra *Listeria* tarafından salınan ActA proteini, bakterinin son kısmında aktin filamanlarının polimerizasyonuna neden olur. F-aktin içeren roket benzeri kuyruklar oluşur ve konak hücre iskeletinde hapsolür. Bu F-aktin kuyrukları, bakterileri sitoplazma boyunca 87 µm / dakikaya varan hızlarda iter (Stevens, 2006). Bakteriler, hücre yüzeyinden komşu hücrelere bile itilebilir (Dhama vd., 2015).

Listeria monocytogenes, konakçı hücre vakuollerinden kaçmasında kritik bir rol oynayan iki farklı fosfolipaz C (Plc) salgılar. Bunlardan ilki fosfatidilinositol-spesifik fosfolipaz C (PI-PLC), diğeri ise geniş aralıklı bir fosfolipaz C (PC-PLC)'dir (Dhama vd., 2015; Smith vd., 1995).

Listeria birçok farklı karmaşık stratejiyle konakçı immun yanıtından kaçır. InlC (internalin C), salgılanmış formda oluştuğu için diğeri internalinler arasında benzersizdir. Enfekte hücrelerde çoğunlukla daha yüksek miktarlarda ifade edilir. Bu internalin, tuba (aktin ve IκB kinazın (IKKα) çeşitli düzenleyici proteinlerini bağlayabilen bir hücre iskeleti proteini) ile etkileşime girip, NF-κB'nin aktivasyonunu bloke eder ve böylece doğal bağışıklık sistemini yavaşlatır (Gouin ve diğeri 2010; Polle ve diğeri 2014).

InlJ aynı zamanda bir adezyon molekölü olarak görev yapsa bile hücre içinde tespit edilemez ve büyük olasılıkla enfeksiyonun sonraki aşamalarında (Sabet vd. 2008), bir başka internalin olan InlH de sitokin IL-6 üretimini en aza indirmek için ifade edilir (Personnic ve diğeri 2010). InlK, *Listeria*'nın otofajiden kaçmasına yardımcı olur (Dortet vd. 2011) (Dhama vd., 2015). *Listerial* P60 proteini, proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açan NK hücrelerinin aktivasyonu yoluyla konakçı bağışıklık mekanizmasını değiştirir (Humann vd., 2007). Flagellin, TLR5 aracılığıyla proinflamatuvar sitokinleri serbest bırakır (Hayashi vd., 2001). LLO, vakuollerin yok edilmesindeki ana rolünün yanı sıra, H3'ün defosforilasyonu ve konak hücrenin H4 histonlarının deasetilasyonu yoluyla konakçı immün sistem aktivitesini azaltmak için de önemlidir (Hamon vd., 2007; Hamon ve Cossart 2011). Salgılanan formdaki LLO, mitokondriyal ağın bölünmesine neden olabilir. *Listeria* ayrıca,

konakçı hücreler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerine karşı savaşmaya yardımcı olan bir süperoksit dismutaz enzimine sahiptir (Stavru vd., 2011).

Bu mekanizmalar, bakterinin antikor ve komplement gibi çözünür immün faktörlere maruz kalmaksızın, hücreden hücreye doğrudan hareket etmesini sağlar (Dhama vd., 2015). Oral olarak alınan bakteri, bağırsaklara ulaşmadan önce midenin olumsuz koşullarına dayanmak zorundadır. Mide asiditesi kontamine gıdalarla alınan *Listeria* organizmalarının önemli bir kısmını yok edebilir (Vázquez-Boland, vd., 2001). Konakta bulunduktan sonra, makrofajlar, epitel hücreleri, hepatositler, fibroblastlar, endotel ve sinir dokusu hücreleri dahil olmak üzere bir dizi fagositik ve fagositik olmayan hücreyi aktif olarak istila ederler (de las Heras vd., 2011). Enfekte konakçılarda, bakteriler hem septisemi oluşturmak hem de mezenterik lenf düğümlerini istila etmek için Peyer plaklarının bulunduğu bölgedeki bağırsak duvarını geçerler. Bağırsak bariyerini geçen *Listeria* organizmaları, lenf veya kan yoluyla mezenterik lenf düğümlerine, dalağa ve karaciğere taşınır (Marco, vd., 1992; Pron, vd., 1998). Karaciğerin bağırsak translokasyonundan sonraki ilk hedef organ olduğu düşünülmektedir (Rouquette ve Berche, 1996). *L. monocytogenes* tarafından konakçı doku kolonizasyonunun bu ilk adımı hızlıdır (Vázquez-Boland, vd., 2001). Farelerin intravenöz yolla deneysel enfeksiyonları, *L. monocytogenes*'in dalak ve karaciğerde yerleşik makrofajlar tarafından kan dolaşımından hızla temizlendiğini göstermiştir (Conlan ve North. 1991; Cousens ve Wing, 2000; Mackaness, 1962). Bakteri yükünün çoğu (%90), muhtemelen Kupffer hücreleri tarafından yakalanıp karaciğerde birikir. Bu yerleşik makrofajlar, bakterilerin çoğunu öldürür. Kupffer hücrelerinin, T lenfositlerin antijene bağımlı proliferasyonunu ve sitokinlerin salgılanmasını indükleyerek anti-listeryal bağışıklığın gelişimini başlattığına inanılmaktadır (Gregory ve Wing, 1990). Bakterilerin tümü doku makrofajları tarafından yok edilmez ve hayatta kalan bakteriler fare organlarında 2 ila 5 gün boyunca sayıları artarak çoğalmaya başlar (Conlan ve North. 1991; De Chastellier ve Berche. 1994; Fleming ve Campbell. 1997; Lepay, vd., 1985). Karaciğerde bakteriyel çoğalmanın başlıca yeri hepatositlerdir (Gregory ve Liu. 2000; Gregory, vd., 1992; Conlan ve North, 1992)

L. monocytogenes fetoplazental engelleri geçme özelliğine sahiptir. Yapılan çalışmalarda *L. monocytogenes*'in plasenta bariyerini hematojen penetrasyon aracılığı ile fetüse ulaştığı gösterilmiştir (Abram ve Doric, 1997; Gray ve Killinger, 1966; Gray, vd., 1955; Osebold, vd., 1960). Gebelik sırasında hücre aracılı bağışıklığın

baskılanmış olması muhtemelen listeriozis gelişimi için önemlidir (Weinberg, vd., 1984). Rodentlerde yapılan çalışmalarda, gebeliğin bakteriye karşı direnci azalttığı (Bortolussi, vd., 1984; Luft, vd., 1982) ve karaciğerdeki birincil enfeksiyonun seyrini önemli ölçüde uzattığı saptanmıştır (Abram ve Doric, 1997).

Bakterilerin beyne nasıl ulaştığına dair, kesin olmayan bazı bilgiler mevcuttur. *L. monocytogenes*, nöroinvasiv bakteriler arasında, MSS'ni en az üç farklı mekanizma ile istila edebilmesi bakımından eşsiz olarak kabul edilir (Drevets vd., 2004). Klasik bilgi olarak, bakteri önce ağız mukozasını, mideyi veya eksternal mukozaları istila etmektedir. Ardından bakteri trigeminal sinir aracılığı ile sentripedal olarak aksonlar ile beyne ulaşmaktadır (Cantile ve Youssef, 2016; Oevermann vd., 2010a). İnsanlardaki listerioziste, bakterinin beyne giriş yolu olarak bazı olgularda, hematojen yayılım sırasında endotel hücrelerinin invazyonu gösterilmiştir (Wilson ve Drevets, 1998). Ayrıca deneysel olarak, kemirgenlerde listeriozis'in beyne kan yoluyla ulaşabileceğini ve bunun için bakteriyemi olmasının gerektiği, bakterilerin serbest halde veya lökositlere bağlı olarak kan beyin bariyerini aşabilecekleri ifade edilmektedir (Berche, 1995; Cantile ve Youssef, 2016; Disson ve Lecuit, 2012).

2.5. Bulgular

Hastalığın klinik sonuçları, alınan organizmaların sayısına, suşların patojenik özelliklerine ve konağın bağışıklık durumuna bağlıdır. *L. monocytogenes* enfeksiyonunun klinik belirtileri tüm duyarlı konaklarda çok benzerdir (Vázquez-Boland, vd., 2001). Listeriosis hayvanlarda klinik olarak meningoensefalitis, abort/erken doğum ve septisemi olmak üzere üç formda görülür (Şekil 2.2). Hastalığın ensefalitik ve genital formları, bireysel veya sürü bazında oluşurlar ve birlikte görülmeleri nadirdir, bu nedenle her sendromun muhtemelen ayrı bir patogenezi vardır (Cantile ve Youssef, 2016).

Gebe uterus listerial enfeksiyona karşı oldukça hassastır. Fetal enfeksiyonun plasentadan hematojen yol ile oluştuğu kabul edilir ve yaklaşık 5-12 günlük bir kuluçka süresine sahiptir. Hem sığırlarda hem de koyunlarda *Listeria*'nın neden olduğu abortlar, gebeliğin son üç ayında meydana gelmektedir. Gebeliğin son trimesterinin erken döneminde uterus enfeksiyonu gelişirse fetüs septisemi sonucu ölür. Ölü fetüs yaklaşık 5 gün içinde dışarı atılır. Bu zamana kadar oluşan otolitik değişiklikler, küçük makroskobik lezyonları maskeler. Fetüs, enfeksiyon geliştiğinde doğuma yakınsa, anormal doğum başlar. Şiddetli metritis ve septisemi görülen en yaygın

komplasyonlardır. Bu dönemdeki fetüslerdeki ve plasentalardaki lezyonların otolitik değişikliklerle gizlenmesi daha az olasıdır. Karaciğerde küçük sarı nekroz odakları ve yüzeysel abomasal erozyonlar makroskopik olarak görülebilir. Bakteriler tipik olarak bu hepatik nekroz odaklarında bulunur. Genellikle sadece mikroskopik olarak görülebilen benzer mikroapse odakları, akciğer, miyokard, böbrek, adrenal bez, dalak ve beyinde bulunur. Bu odakların merkezinde az sayıda dejenere nötrofil ve mononükleer hücreden oluşan bir nekroz alanı vardır. Fetüs doğuma yakınsa, şiddetli diffüz non-purulent beyin-omurilik meningitisi de şekillenebilir (Schlafer ve Foster, 2016).

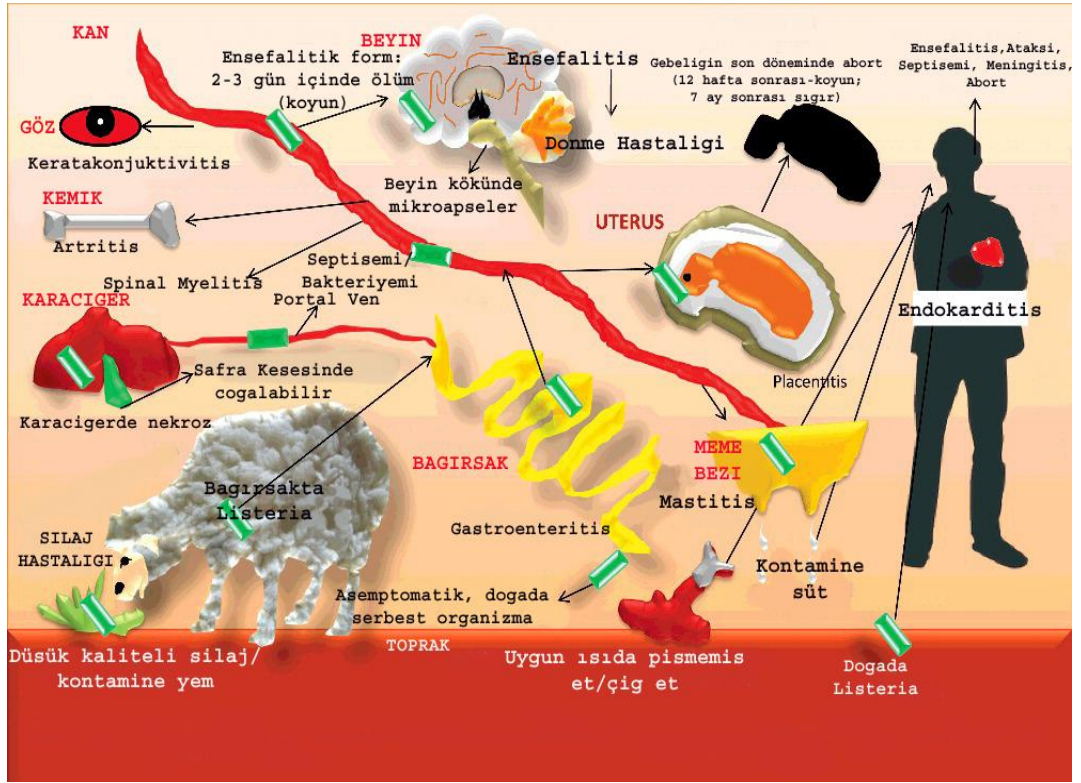
Septisemik (sistemik) listeriosis, aborte fetüslerde ve yenidoğan kuzularda, 1 haftalık yaşa kadar olan buzağı ve taylarda, diğer hayvanlarda ise birkaç aylıkken ortaya çıkar ve multisistemik bakteriyel kolonizasyon ile multifokal multisistemik koagülatif nekroz veya mikroapse oluşum alanları ile karakterizedir. Nekrotik alanlar veya mikroapseler milier dağılım gösterir ve karaciğerde çok sayıdadır. Ancak kalpte ve diğer iç organlarda, nötrofillerin ve daha az makrofaj infiltrasyonunun olduğu doku litik nekrozu ile karakterize çok daha az sayıda milier mikroapseler görülür. Yenidoğanlar genellikle uterusu enfekte olurlar (Cantile ve Youssef, 2016).

Listerial ensefalit, neredeyse yalnızca yetişkin ruminantlarda görülür (Cantile ve Youssef, 2016). Ensefalitik form, hayvanın bir yönde daireler çizerek hareket etmesi nedeniyle "dönme hastalığı" olarak bilinir (OIE, 2018). Meningoensefalitik listeriozide oluşan klinik belirtiler, beyin kökündeki lezyonlara ilişkindir. Hastalığın şiddetine ve yerleşimine göre klinik belirtiler değişiklik gösterir; donukluk, tortikollis, koordinasyon bozukluğu, daire içinde yürüme, başın duvar veya kapı gibi sağlam bir cisim elde edene kadar öne doğru itilmesi ve tek taraflı fasiyal paraliz (tükürük salgısı, göz kapağı ve kulakta sarkmalara neden olan) görülür (Scott, 2013). Medulla ve ponsdaki yangıdan dolayı, kranial sinir disfonksiyon belirtileri oluşur. Genellikle belirtilerden birkaç gün sonra solunum yetmezliği nedeniyle 2-3 gün içinde ölüm şekillenir (Cantile ve Youssef, 2016; Dhama vd., 2015; OIE, 2018).

Genellikle makroskopik lezyon görülmez, fakat birkaç lezyon bildirilmiştir. Bunlar; leptomeningeal opasite, diaterde V-VIII. sinir bölgesinde sert kahve odaklar, hemoraji, terminal beyin kökünde nekroz, BOS'un bulanıklaşmasıdır (Cantile ve Youssef, 2016).

Listeria belirgin olarak beyin köküne affinite gösterip, en şiddetli lezyonlar

medulla ve ponda daha az olarak rostral olarak talamus, kaudal olarak spinal kordun servikal bölgesinde görülmektedir. Mikroskobik olarak, pons ve medulla merkezli gri ve beyaz maddede meningoensefalitis karakteristiktir. Ancak lezyonlar diansefalondan, kaudal medulla veya kranial servikal spinal korda kadar yayılabilir. Küçük, erken lezyonlar, mikroglial hücrelerin serbest kümelenmeleridir. Zamanla bu lezyonlar genişler ve çok sayıda nötrofili içerir. Daha sonra nötrofiller baskın hale gelip mikroapseleri oluşturur. Fakat bazı odaklarda makrofajlar öncelikli hücre tipi olabilir. Karakteristik lezyon parankimde bulunan mikroapselerdir. Bunun dışında aralarında az sayıda nötrofil lökositin olduğu yoğun perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları ve fokal gliosis hastalığın tipik bulguları sayılabilir. Lezyonlarda çok sayıda Gram pozitif etkenleri, görmek mümkün olabilir. Leptomeningitis her olguda rastlanır ve genellikle de şiddetlidir. Trigeminal sinir ve gangliyonu içeren kranial gangliyonöritis de sıklıkla bulunur. Mikroapseler birleşerek beyin dokusunda yumuşama ve zaman zaman malasiye neden olabilmektedir (Cantile ve Youssef, 2016; Dreyer vd., 2015; Krueger vd., 1995; Oevermann vd., 2008). Oevermann vd. (2010), bu mikroapseleri yapısına göre sınıflandırmışlardır. Nötrofillerin daha baskın olduğu mikroapseler akut ve tip 1 olarak, makrofajların baskın olduğu bazen çok çekirdekli dev hücrelerinin olduğu lezyonlar ise kronik ve tip 2 mikroapseler olarak tanımlanmıştır. Ancak, çoğu olguda lezyonların her iki tipin karışımından ibaret olmaları nedeni ile bu yapıdaki lezyonlar subakut olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 2.2. Hayvanlarda ve insanlarda listeriyozun bulaşması ve klinik bulguları (Dhama, vd., 2015).

Perinatal septisemi ve yenidoğan koyun ve keçilerde, süttten kesilmiş koyunlarda gastroenteritis, spinal miyelitis (ateş, arka bacak güçsüzlüğüne ve felce doğru ilerlemesi ile birlikte ataksi), oftalmitis ve bazen nadir de olsa mastitis de meydana gelmektedir (Dhama vd., 2015; OIE, 2018; Otter vd., 2004; Winter vd., 2004). Mastitis, memenin sadece dörtte birini etkileyen nadir bir listeriozis belirtisidir ve antibiyotiklere yanıt vermez (Rawool vd., 2007). Sığırlarda tek taraflı üveitis ve keratokonjunktivitis de bildirilmiştir (Staric, vd., 2008).

Listeria monocytogenes, az sayıdaki insanda ve sırtında birden fazla nodülü olan bir köpekte pyodermanın nedeni olarak gösterilmiştir (Loncarevic, vd.,1999; Cantile ve Youssef, 2016). Bufalolar ayrıca genital sistem enfeksiyonlarının yaygın olduğu listeriozise de duyarlıdırlar. Listeriyozun serebral formunun develerde de görüldüğü bildirilmektedir (Al-Swailem, vd., 2010).

Bazen septisemik hastalık formu atlarda ve domuzlarda da görülürken, domuzlarda encefalit form hakkında raporlar mevcuttur. Listeriozis salgınları kanatlılarda sporadik olarak nadiren bildirilir ve bazen de genç civcivlerde gözlenir. Kuşlar hastalığın subklinik taşıyıcıları olmakla beraber, oluştuğunda genellikle septisemi veya lokalize encefalitis ile seyredir. *L. monocytogenes* evcil hayvanlarda ve kuşlar dışında kemirgenleri ve vahşi hayvanları da etkilemektedir (OIE, 2018).

2.6. Listerial Ensefalitis (Rombensefalitis) ve Hücresel Bağışıklık Yanıt

Merkezi sinir sistemine ulaşan bakteriler arasında *L.monocytogenes*, insan ve ruminantlarda en ölümcül olanlardan birisidir (Disson ve Lecuit, 2012). Yapılan son deneysel çalışmalarda *L. monocytogenes*'in mikroglialar yanında direkt olarak nöronları ve koroid pleksus epitel hücrelerini de enfekte ettiği gösterilmiştir. Aksonal hasar ve nöronal ölüm, özellikle listeriolizin ve lipazların etkisi ile muhtemelen yangı sürecine katkıda bulunur (Cantile ve Youssef, 2016).

Doku hasarı mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Ancak nöron ve aksondaki hasar, muhtemelen yangıya ilişkin sekonder olarak şekillenir. Hücresel yanıt ve beyin hasarının şiddeti arasında bağlantı olabileceği bildirilmektedir (Cantile ve Youssef, 2016). Fare modellerinde yapılan son araştırmalar, hastalığın geç safhalarında T lenfosit cevabının önemli olduğunu göstermektedir. Deneysel enfeksiyondan önce yapılan immunizasyon, CD4⁺ ve CD8⁺ T- lenfosit yanıtını artırır ve iyi bir bağışıklık sağlar. Farelerde yapılan diğer araştırmalarda ölümle sonuçlanan enfeksiyonda TNF- α (Tumor Nekrosis Faktor) ve IL-10 üretiminin arttığı gösterilmiştir. TNF- α beyin hasarına (apoptotik hücre ölümü) ve MSS'nin immun cevabının artmasına neden olurken, IL-10 ise, immünolojik reaksiyonlar üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahiptir (Qiu vd., 2018).

Listerioziste bakterilere karşı konakçıda oluşan hücresel ve humoral bağışıklık yanıtına ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Buna rağmen *L.monocytogenes*'in MSS'ni nasıl istila ettiği ve bunun sonucunda ortaya çıkan bağışıklık tepkilerinin etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Enfekte mikroglial hücreler, enfeksiyon bölgesine TNF- α ve MCP-1 gibi inflamatuvar sitokinler salgılar. Mikroglia tarafından sitokin üretiminin sonuçları ve enfeksiyonun mikroglial hücreler üzerindeki etkisi bilinmemektedir (Maudet, vd., 2021). Karaciğerde, Kupffer hücreleri olarak bilinen yerleşik makrofajlar, etkeni aktif olarak fagosite edip, hızla ölümlerine yol açarak yangısal monositlerin enfeksiyona katılmalarını tetikler. Karaciğerin listerial enfeksiyonu ilk önce bir M1 (klasik olarak aktive olmuş makrofaj) proinflamatuvar yanıt tarafından kontrol edilir, ardından infiltre monositlerin M2 (alternatif yolla aktive olmuş makrofaj) polarizasyonu şekillenerek, bu hücrelerin proliferasyonlarına ve makrofajlara farklılaşmasına izin verir (Blériot, vd., 2015). Nörolisteriozis sırasında MSS'nde benzer bir sürecin gerçekleşip gerçekleşmediği araştırılmaya devam etmektedir. MSS'ndeki proinflamatuvar sinyal, zararlı olabilir ve uzun vadeli nöronal

hasarlara neden olabilir (Forrester, vd., 2018). Bununla birlikte mikrogial hücrelerin yenilenmesi, MSS'nde immün fonksiyonların değişmesine yol açabilir (Bennett ve Bennett, 2020). Referans laboratuvar suşlarının nöroinvaziv yeteneğinin zayıf olması nedeniyle, şimdiye kadar ayrıntılı mekanik in vivo çalışmalar yapılamamıştır (Maury, vd., 2016).

2.7. Listerial Enfeksiyona Karşı Konakçı Hücre Yanıtı

Farelerde deneysel *L. monocytogenes* enfeksiyonuna karşı doğal ve kazanılmış bağışıklık tepkilerinin incelenmesi, bu hastalıkta bağışıklık sisteminin nasıl çalıştığına dair önemli kazanımlar elde edilmiştir. Murin listeriosis, konakçı ve patojen arasındaki bir dizi karmaşık etkileşimi barındırmaktadır ve birkaç anahtar nedenden dolayı ilgi çekici bir enfeksiyon modeli olarak hizmet etmektedir. Bunlardan ilki enfeksiyonun tekrarlanabilir olmasıdır. Bununla birlikte, konaktaki bakteri yükleri kolayca sayılabilir özelliktedir. Bir diğer neden ise öldürücü olmayan dozlarda *L. monocytogenes*'in, güçlü bir bağışıklık tepkisine neden olmasıdır. *L. monocytogenes*, bireysel virülans faktörlerinin silinmesine veya farklı antijenleri ifade eden genlerin eklenmesine izin vermesinden dolayı genetik olarak da izlenebilir özelliğe sahiptir (Zenewicz ve Shen, 2007).

2.7.1. Doğal Bağışıklık Yanıtı

Doğal bağışıklık yanıtları, *L. monocytogenes* enfeksiyonunun erken kontrolü için gereklidir. Bu yanıtlar, bakterinin çoğalması ve yayılmasını kontrol etmede önemli bir rol oynayarak, sistemik, ölümcül enfeksiyona dönüşmesini önler (Zenewicz ve Shen, 2007).

2.7.1.1. Fagositik Hücreler

Nötrofiller, bu enfeksiyonda antimikrobiyal aktiviteleri aracılığı ile bakteriyel gelişmenin ilk kontrolü için önemli hücrelerdir (Czuprynski vd., 1994; Rogers & Unanue, 1993). Listerial bakterileri yutarak öldürebilir ve ardından reaktif nitrojen ve oksijen ara ürünleri üretebilirler (Segal, 2005). Ayrıca bakterileri tuzağa düşüren ve öldüren granül türevi proteinler ve kromatinden oluşan hücre dışı tuzakları (NET'ler olarak adlandırılır) serbest bırakarak hücre dışı bakterileri de öldürebilirler (Brinkmann vd., 2004). Nötrofiller, sitokin IL-6 ve diğer faktörler tarafından hızlı bir şekilde enfeksiyöz odaklarına alınır ve ardından makrofajlara enfeksiyon bölgesine giden trafiğe sinyal gönderen CSF-1 (The colony stimulating factor 1) ve MCP-1 gibi

kemokinler salgırlarlar (Guleria & Pollard, 2001; Mandel & Cheers, 1980).

Makrofajlar, *L. monocytogenes* enfeksiyonu sırasında doğal bağışıklığın odak noktası olmuştur. Çünkü bakteri replikasyonu başlıca makrofajlarda meydana gelmesi yanında, bakterilerin temizlenmesine aracılık etmede de önemli hücrelerden birisidir. Yerleşik makrofajlar, özellikle karaciğerdeki Kupffer hücreleri, dokudaki bakterilerin çoğunun öldürülmesinden ilk sorumlu hücrelerdir (Zenewicz ve Shen, 2007). Makrofajlar enfeksiyona yanıt olarak TNF α ve IL-12 salgırlar (Havell, 1987; Tripp vd., 1993; Hsieh). Bu iki sitokin, doğal katil (NK) hücrelerini IFN γ üretmeye yönlendirir, bu da makrofajların aktivasyonuna yol açar ve bakterisidal aktivitelerini artırır. Nötrofillerde olduğu gibi, *L. monocytogenes*'in makrofaj aracılı öldürülmesi için reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünlerinin oluşturulması önemlidir (Zenewicz ve Shen, 2007).

2.7.1.2. Yangısal sitokinler

IFN γ (tip II interferon), birincil *L. monocytogenes* enfeksiyonunu kontrol etmek için olasılıkla en önemli sitokindir ve NK hücreler ile $\gamma\delta$ T hücreler (gama/delta T hücre reseptörlerini taşıyan T hücreleri) IFN γ 'nin önemli erken kaynaklarıdır (Hiromatsu vd., 1992; Tripp vd., 1993). IFN γ indüksiyonuna ek olarak, *L. monocytogenes*'in tip I interferonları da indüklediği uzun zamandır bilinmektedir (Havell, 1986; Nakane & Minagawa, 1984). Tip I interferonların indüksiyonu, bağışıklık sisteminin birçok viral patojeni temizlemesi için gereklidir. *L. monocytogenes* tarafından tip I interferonların indüksiyonu, aksine bakteriler için faydalıdır. Bazı araştırmacılar (Carrero vd., 2006; Zenewicz ve Shen, 2007), tip I interferonların *L. monocytogenes* enfeksiyonu sırasında erken dönemde T hücresi apoptozunu indüklediğini ve bunun sonucunda fagositik hücreler tarafından daha fazla IL-10 salgılanmasına neden olarak doğuştan gelen immün yanıtı azalttığını göstermişlerdir.

2.7.1.3. Toll-benzeri reseptör tanıma

Fareler tarafından ifade edilen 11 farklı Toll benzeri reseptör (TLR) için birçok farklı bakteriyel, viral ve protozoondan türetilmiş ligandın yanı sıra sentetik ligandlar da tanımlanmıştır. TLR'ler, makrofajlar dahil birçok farklı immün hücre alt grubu tarafından eksprese edilir. Patojen kaynaklı ürünlerin TLR tarafından tanınması, bu hücrelerin aktivasyonuna yol açar ve bu da farklı yangısal sitokinlerin ekspresyonunun

artmasına neden olur. *L. monocytogenes*, makrofajları aktive edebilen peptidoglikan, flagellin ve bakteriyel DNA dahil sayısız TLR ligand ekspresyonuna sahiptir. *L. monocytogenes* tanıma için en önemli TLR, TLR2 olarak görünmektedir. TLR ligandının uygun reseptörüne bağlanması, farklı sitokin ve antijen sunumuyla ilgili genlerin ekspresyonuyla sonuçlanır ve bu da transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin aktivasyonuna giden bir sinyalleme kaskadını başlatır (Zenewicz ve Shen, 2007).

2.7.1.4. Hücre içi immünitinin *L. monocytogenes*'i tanınması

Son zamanlarda, enfekte olmuş hücrenin kendi içindeki enfeksiyonu tespit etmek için bazı mekanizmalara sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Fagozomdan kaçabilen canlı bakteriler, ısıyla öldürülen veya kaçan bakterilere göre bağışıklık tepkisinin daha iyi uyarıcılarıdır. Canlı *L. monocytogenes* ile in vitro enfekte olmuş dendritik hücreler (DCler), T hücresi aktivasyonu için daha fazla yüzey ortak-uyarıcı molekülü ifade eder ve ısı ile öldürülmüş bakterilerle uyarılan DC'lerden daha fazla miktarda proinflamatuvar sitokin salgılar (Brzoza vd., 2004). Makrofajlarda, fagozomdan kaçabilen bakterilerin enfeksiyondan birkaç saat sonra, benzersiz bir gen ekspresyon modeli oluşturmasında da benzer bir fenomen gözlemlenmiştir (McCaffrey vd., 2004; Zenewicz ve Shen, 2007).

Hücresel sistemin, sitozolik bakterileri tanıdığı ve böylece hücre içi tepkileri başlattığı düşünülen birkaç anahtar molekül tanımlanmıştır. Sitosolik proteinlerin NLR (nod-like reseptör) ailesi, yaklaşık 20 üye içerir. Bunlardan ikisi, nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domain (NOD) proteinleri (NACHT- ve LRR-) ve pirin alan içeren proteinleridir (NALP'ler) (Ting & Davis, 2005). Sitosolik mikrobiyal ürünlerin tanınması, TLR sinyallemesinden farklı sinyal kademelerini başlatır ve farklı bağışıklık tepkileri ile sonuçlanır. En iyi çalışılmış NLR ailesi üyeleri, sırasıyla Crohn hastalığı ve Muckle-Wells sendromunda yangısal bozukluklar ile ilişkileri nedeniyle NOD2 ve NALP3'tür. Hem NOD2 hem de NALP3, hücre içi *L. monocytogenes*'in tanınmasında rol oynar. Cryopyrin olarak da bilinen NALP3, doğal ve kazanılmış immün yanıtların aktivasyonu için önemli olan olgun IL-1 β ve IL-18'in işlenmesine ve salgılanmasına yol açan kaspaz-1'i aktive eden hücre içi yangısal kompleksin bir bileşenidir (Mariathasan vd., 2006).

2.7.1.5. Otofaji

Hücre içi bakteriler hücre tarafından tanındığında, patojenleri yok etmeye çalışabilir. Bu, otofaji süreciyle de başarılabilir (Xu ve Eissa, 2010). Otofaji ilk olarak, hücrelerin kendi hücre içi organellerini ve sitoplazmik içeriklerini geri dönüştürmelerinin bir yolu olarak keşfedilmiştir. Daha sonra bu fenomen, invazif grup A *Streptococcus* ve *Mycobacterium tuberculosis* dahil hücre içi patojenler için iyi tanımlanmıştır (Gutierrez vd., 2004; Nakagawa vd., 2004). Otofagolizozomlarda birçok hücre içi bakteri bulunabilir. Hücre içi *L. monocytogenes* otofagositozlanabilir, ancak bu sadece makrofajlar kloramfenikol ile ilk tedavi edildiğinde gözlenmiştir (Rich vd., 2003). Muhtemelen, *L. monocytogenes*'in otofagositozu, hücre içi hareketliliği ve LLO'nun salgılanması bakteri çevresinde zar oluşumunu engelleyebildiğinden, diğer bakteriyel patojenlere kıyasla nadir bir olay olabilir (Zenewicz ve Shen, 2007).

2.7.2. Kazanılmış bağışıklık yanıtları

L. monocytogenes'e özgü kazanılmış bağışıklık yanıt, doğal bağışıklık yanıtları takip etmektedir ve DC'ler, doğal ve kazanılmış bağışıklık arasındaki bağlantıyı sağlayan önemli bileşenlerden birisidir (Takeda ve Akira, 2005). Patojenden kaynaklanan ürünlerin TLR'ler tarafından özel olarak tanınması, DC'nin aktivasyonuna yol açan bir sinyal kaskadı başlatmaktadır. Bu aktivasyon, T hücreleri uyaran moleküllerin ve sitokinlerin daha fazla ifade edilmelerine yol açar (Jung vd., 2002). Bakterinin hücre içine girişiyle birlikte, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre yanıtı, kazanılmış immün yanıtın büyük çoğunluğunu oluşturur. B hücreleri, düzenleyici T hücreleri ve klasik olmayan MHC T hücreleri de CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre yanıtlarını etkileyerek bu yanıtta katkıda bulunur (Zenewicz ve Shen, 2007).

2.7.2.1. CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre yanıtları

Doğal bağışıklık hücreleri *L. monocytogenes* enfeksiyonunun ilk kontrolü için önemli olmasına rağmen, bakterilerin tam temizliği için T hücrelerine ihtiyaç vardır. CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri sterilize edici bağışıklık kazandırmak için önemlidir (Bancroft vd., 1991; Bhardwaj vd., 1998).

Bağışıklık sistemi tarafından enfeksiyonun tanınması, patojenleri ortadan kaldırmanın ilk ve en önemli adımıdır. *L. monocytogenes* gibi hücre içi bir bakteriyel patojen için, enfekte olmuş hücrelerin tanınması, enfeksiyonun kontrol edilmesi

açısından oldukça kritiktir. *L. monocytogenes* antijeni, enfekte olan hücre tipine bağlı olarak çeşitli şekillerde T hücrelerine sunulabilir. *L. monocytogenes* hemen hemen her hücre tipinin sitozolünde olduğunda, salgıladığı proteinler konakçı proteazom tarafından bozulmaya maruz kalır. Bozulan bu peptitler daha sonra endoplazmik retikuluma taşınır, MHC sınıf I molekülleri üzerine yüklenir ve hücre yüzeyinde CD8⁺ T hücrelerine sunulur. Profesyonel antijen sunan hücreler, MHC sınıf II yolu üzerinden CD4⁺ T hücrelerine lizozomlarda yok edilen bakterilerden antijen sunabilir. Bu nedenle, *L. monocytogenes* antijenlerinin T hücrelerine sunulması, enfekte olan hücrenin tipine ve ayrıca antijenin bölümlendirilmesine bağlıdır (Zenewicz ve Shen, 2007).

Yaygın görüş, CD8⁺ T hücrelerinin iki sinerjistik mekanizma yoluyla anti-listerial bağışıklığa aracılık ettiği yönündedir: (1) hücre içi bakterileri açığa çıkarmak için, enfekte olmuş hedef hücreleri perforin ve granzimler yoluyla parçalamak, böylece aktive makrofajlar tarafından öldürülmelerini sağlamak ve (2) makrofajları aktive etmek için IFN γ salgılamak (Harty ve Badovinac, 2002). *L. monocytogenes* enfeksiyonunun kontrol edilmesinde CD4⁺ T hücrelerinin rolü, CD8⁺ T hücrelerinininkinden daha az anlaşılmıştır. *L. monocytogenes*, güçlü bir Th1 yanıtı indükler ve CD8⁺ T hücreleri gibi, *L. monocytogenes* spesifik CD4⁺ T hücreleri de makrofaj aktivasyonuna yardımcı olabilen IFN γ salgırlar (Daugelat vd., 1994; Zenewicz ve Shen, 2007).

2.7.2.2. B hücre yanıtı

Bakterilerin önemli bir kısmı enfeksiyon sırasında hücre içi kaldığından ve hücre dışı ortama çıkmaksızın hücre içi yayılma gösterdiğinden, B hücreleri ve antikor yanıtın *L. monocytogenes* enfeksiyonunu kontrol etmede sınırlı bir etkisi olduğu ifade edilmektedir (Zenewicz ve Shen, 2007). Hastalığın kendisi çok yüksek oranlarda antikor titreleri oluşturmamakla beraber, bakterinin por oluşturan virulens faktörü LLO'ya karşı elde edilen monoklonal bir antikorun, LLO'yu hücre içi nötralize ederek ve fagozomdan bakteriyel kaçıışı engelleyerek, koruma sağlayabileceği bildirilmektedir (Edelson ve Unanue, 2001). Son olarak, B hücrelerinin, *L. monocytogenes* enfeksiyonu sırasında oluşturulan bellek CD8⁺ T hücrelerinin korunmasında önemli olduğu gösterilmiştir (Shen vd., 2003). Dolayısı ile B hücreleri ve antikorlar bu enfeksiyonda minör bir role sahip olmakla beraber, bu etkileri önemli görülmektedir.

2.7.3. Epitel Hücre İnvazyonu ile İlişkili Sinyal İletim Yolları

Normalde fagositik olmayan hücrelere giriş sırasında *Listeria* organizmaları tarafından tetiklenen sinyal olayları hakkında çok az şey bilinmektedir. İnternalin B aracılı *L. monocytogenes* alımının PI3K aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, PI3K tarafından katalize edilen reaksiyon ürünleri olan fosfoinositid-fosfatlar, aktin hücre iskeletine doğrudan müdahale edebilir ve böylece hücre iskeleti dinamiklerini etkileyebilir (Ireton vd., 1996; Ireton vd., 1999). Buna ek olarak, lökotrienlerin epitel hücrelerinin istilası sırasında *L. monocytogenes* sinyallemesinde de rol oynadığı düşünülmektedir. MEK-1/ERK-2 aktivasyonu, konak epitel hücrelerine *L. monocytogenes* girişine yol açan sinyal iletim sisteminin bir bileşimini oluşturabilir (Vázquez-Boland vd., 2001).

2.7.4. Makrofajlarda NF-κB'nin Aktivasyonu ve Konak Gen İfadesinin Modülasyonu

İmmünolojik açıdan önemli birçok genin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alan NF-κB, tüm hücre tiplerinde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. *Listeria monocytogenes* enfeksiyonu, makrofajlarda transkripsiyon faktörü NF-κB'yi artırır. *L. monocytogenes*'in sitoplazmaya çıkması, kalıcı NF-κB aktivasyonunu indüklemek için PrfA-bağımlı proteinlerde bir önkoşuldur. *L. monocytogenes* ile enfekte makrofajlarda kalıcı NF-κB aktivitesi muhtemelen fagozomdan kaçış sırasında ya da hücre içi kopyalanan bakteriler tarafından indüklenen bir sinyale dayanır. Yüksek seviyede kalıcı NF-κB aktivasyonuna yol açan mekanizma açıkça ActA, PC-PLC ve PI-PLC'ye bağlıdır. Bununla birlikte, kalıcı NF-κB aktivasyonu, memeli hücresinde ifade edilen bakteriyel virülans gen ürünleri yoluyla modüle ediliyor olduğu kabul edilmektedir (Hauf vd., 1997).

2.7.5. Endotel Hücrelerinin Enfeksiyonu Sırasında Konakçı Yanıtları

Listeria monocytogenes'in internalinleri (InlA ve InlB), beyni istila etmeyi kolaylaştırmak için hücrel reseptörleri E-kaderin ve mezenkimal-epitel geçişi (MET) ile etkileşime girer. *L. monocytogenes* türleri, endotelial hücrelerde NF-κB'yi aktive ederek P- ve E-selektin, hücreler arası adezyon molekülü 1 (ICAM-1), Vasküler hücre adezyon proteini 1 (VCAM-1), IL-6, IL-8 ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ekspresyonunu teşvik eder. Bakteri tüm bu moleküllerin yardımıyla kan-beyin bariyerini geçebilir (Al-Obaidi ve Desa, 2018).

2.8. Doğal bağışıklıkta tanıma molekülleri (Alarminler)

Ruminantlarda listerioziste beyinde şekillenen bağışıklık yanıtında rol alan hücreler (Di Palma vd., 2012; Krueger vd., 1995) ile bazı sitokinlerin (Abdlla vd., 2015) belirlenmesine ilişkin detaylı çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte immun sistem için erken uyarı sinyalleri olarak etki eden ve temelde endojen olarak bulunan alarmin denen bazı moleküllerle ilgili çalışmalara veteriner hekimlik alanında pek rastlanmamaktadır. Alarminler aslında hücre ölümü, doku hasarı ya da mikrobiyal saldırı gibi tehlike durumlarında açığa çıkan, endojen DAMP (Damage-associated molecular patterns-hasar ilişkili moleküler yapılar) molekülleridir ve tehlike durumlarında immun sistemi uyarıcı etki yaparlar (Matzinger, 1994; Nie vd., 2016). DAMP molekülleri başlıca lökositlerin (özellikle de antijen sunan hücrelerin) aktivasyonunu ve göçlerini sağlayarak immun sistemi uyarmak üzere kemotaktik ve PRR (Pattern recognition receptors; kalıp tanıma reseptörleri=Toll benzeri reseptör ve Retinoik asit-indüklenebilir gen 1 benzeri reseptör= RIG-I benzeri reseptörler= RLR gibi)'ni duyarlı hale getirirler. Alarminler koruyucu amaçlı, konakçı yanıtına katkı yapan immunostimulatör DAMP'lar olarak kabul edilirler, fakat tüm DAMP'ların immunostimulatör özelliği yoktur. Bazen de DAMP'lar sitokin gibi hücreler arasında uyarı işlevine sahip olduklarından ve sitokin fırtınası denen tarzda aşırı immun yanıt oluştuğunda konakçı için tehlikeli olarak kabul edilirler. DAMP ve alarmin ifadeleri literatürde bazen birbiri yerine kullanılan iki terim olarak karşımıza çıkmaktadır (Nie vd., 2016; Oppenheim ve Yang, 2005; Yang vd., 2009).

Şimdiye kadar belirlenen alarminler birkaç kategoride sınıflandırılmıştır (Nie vd., 2016):

Tablo 2.1. İyi tanımlanmış alarminler, reseptörleri ve biyolojik rolleri (Nie vd., 2016)

Alarmin	Reseptör	Biyolojik aktivite ve fonksiyon
AMP (anti-mikrobiyal peptidler)		Antimikrobiyal etki
Defensin (α , β , θ)	CCR2, CCR6, TLR4	Lökosit çıkışı
Katolisidinler (LL-37 ve CRAMP)	FPRL1/FPR2, TLR7, 8, 9	Sitokin oluşumu
EDN ve diğerleri	TLR2	APC/DC aktivasyonu, immun yanıt uyarımı ve yangı
DNA bağlayan proteinler		Gen ekspresyonunun düzenlenmesi
HMGN1	TLR4	Lökosit çıkışı
HMGB1	CXCR4 ve RAGE	Sitokin salınımı
IL-1 α	TLR2, 4, 7, 8, 9, CD24	APC/DC aktivasyonu

IL-33	IL-1R ve ST2	İmmun yanıtın uyarımı ve yangı
HSP (Isı şok proteinler) HSP70, 90, 96	CD14, CD40, CD91, TLR2, 4 süpürücü reseptörler (SRA1)	Protein korunması APC/DC aktivasyonu, Treg hücre polarizasyonu, yangı
İyon bağlayan proteinler Laktoferrin S100A8 ve S100A9	RAGE, TLR2, 4 RAGE, TLR4	Lökosit çıkışı Sitokin oluşumu APC/DC aktivasyonu, immün yanıtın uyarımı, yangı
Diğerleri ATP ve diğer	P2Y ₂ , 6, 12, P2X ₇	Lökosit çıkışı Sitokin oluşumu, APC/DC aktivasyonu, yangı

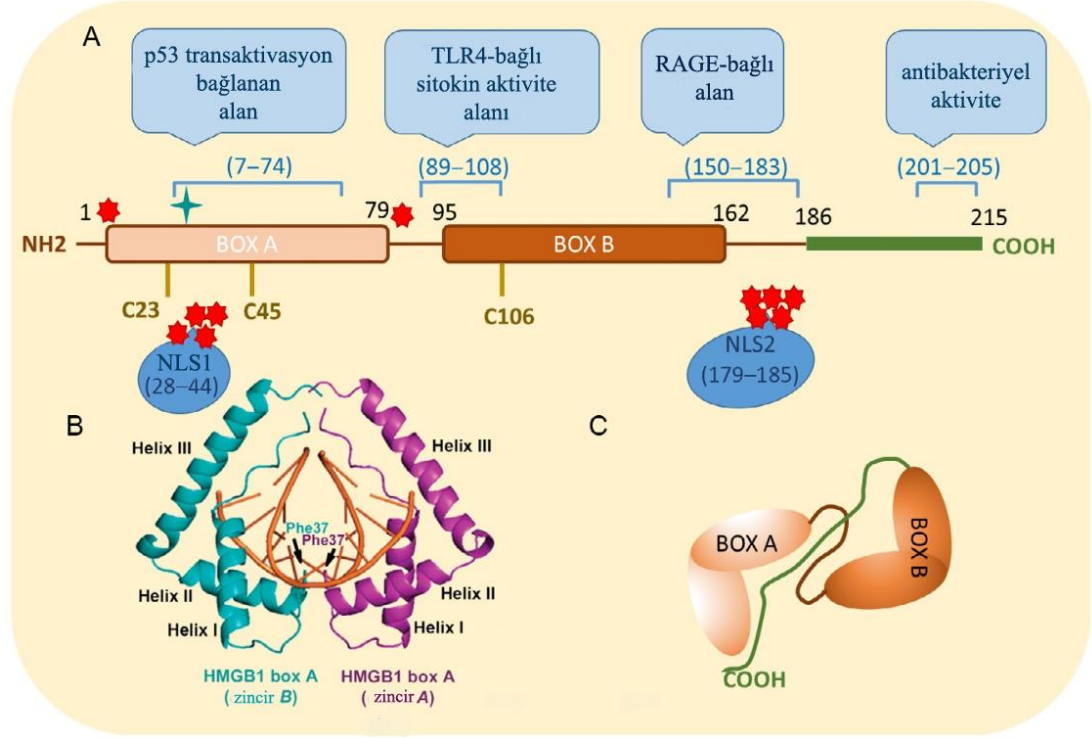
CCR=CC kemokin reseptör, TLR=Toll-benzeri reseptör, LL-37=lösin-lösin-37(katilisidin ilişkili antimikrobiyal peptit), CRAMP=Kathelin ilişkili antimikrobiyal peptit, FPRL=formil peptit reseptör benzeri, EDN=eosinofil kaynaklı nörotoksin, HMGB1=high mobility group box 1 protein, HMGN1=Yüksel mobilite grup nucleosom bağlı alan 1 protein, IL=interlökin, CXCR=CXC kemokin reseptör, RAGE=gelişmiş glikasyon son ürünleri için reseptör, ST2=IL-33 reseptörü, HSP=ısı şok protein, APC=antijen sunan hücreler, DC=dendritik hücre.

2.9. HMGB1 (High Mobility Group Box-1)

Alarmin aktivitesine sahip doğal bağışıklıkla ilgili antimikrobiyal peptit ve proteinler arasında defensinler, cathelicidin, EDN yanında HMGB1 en iyi tanımlanmış, yapısal olarak farklı moleküllerdir ve fonksiyonları iyi bilinmektedir (Oppenheim ve Yang, 2005; Nie vd., 2016). Adı geçen DAMP'lar içerisinde non-histone nükleer bir protein olan HMGB1 bunların prototipi olarak kabul edilir ve en çok çalışılan high-mobility group (HMG) proteinlerdendir (Andersson vd., 2014; Pisetsky, 2011; Yanai vd., 2013). HMG proteinlerin temel görevleri nükleozomlara bağlanarak kromozom yapısını ve gen transkripsiyonunu düzenlemektir (D. Yang vd., 2010). HMG proteinler'ler 30 yıl kadar önce ilk kez belirlenmiştir ve HMGA (HMGA1a, 1b, 1c ve 2), HMGB (HMGB1-4) ve HMGN (HMGN1, 2, 3, 4 ve NBD-45) ailesi olarak sınıflandırılırlar (Bianchi ve Agresti, 2005; Graham H. Goodwin vd., 1973; Hock vd., 2007). HMG proteinler hemen hemen tüm embriyonik dokularda mevcuttur ve gelişimle birlikte bazılarının (HMGA1, HMGB2, HMGB3 ve HMGN1 ve HMGN2) ekspresyonları kaybolur (Hock vd., 2007). Embriyonik gelişme ve hücre farklılaşmasında anahtar rol oynar (Muller vd., 2004).

HMGB1, A ve B kutuları olarak adlandırılan iki katlanmış sarmal DNA bağlama motifi ve bir dizi glutamik ve aspartik asit içeren asidik bir kuyruk içerir. HMGB1, sırasıyla A kutusunda (aa 28–44) ve B kutusunda (aa 179–185) bulunan iki NLS (Nükleer yerleşme bölgesi)'ye sahiptir. NLS1'de dört adet korunmuş lizin kalıntısı varken, NLS2'de bu sayı beştir (Şekil 2.3). Asetilasyon modifikasyonuna duyarlıdırlar, bu da nükleer dışlama ve ardından HMGB1'in serbest kalması(Şekil 2.3-A) ile

sonuçlanır. İki yakın simetrik boxA alanı, DNA'yı bükme için işbirliği yapar (Şekil 2.3-B)(Sanchez-Giraldo vd., 2015; Ugrinova ve Pasheva, 2017).



Şekil 2.3. HMGB1 protein yapısının şeması (Ugrinova ve Pasheva, 2017).

HMGB1 hem hasarlı nekrotik dokularda hem de aktive olmuş monosit/makrofaj, dendritik hücreler ve doğal katil (NK) hücrelerden salınabilir. HMG proteinlerin salınımı PAMP'lar (pathogen-associated molecular patterns, örneğin Toll-like reseptörler), bakteriler, iskemi/reperfüzyon'un yol açtığı hipoksi veya proinflamatuvar sitokinlerce başlatılabilir (Yanai vd., 2013; D. Yang vd., 2010). Önceleri HMGB1, non-infeksiyöz veya steril yangısal olaylarda, immun sistemin uyarılmasında görev alan bir DAMP olarak kabul edilirdi. Bununla birlikte son zamanlarda infeksiyöz ve steril yangıların birleşim noktasında HMGB1'in biyokimyası, moleküler biyolojisi ve immünolojisi konularındaki önemi vurgulanmakta ve yangıya ilişkin gelecekte tedavi amaçlı ilaç geliştirilmesindeki potansiyeli ortaya konulmaktadır (Andersson vd., 2014). Ekstrasellüler HMGB1'in steril ve enfeksiyöz hasarda yangıya neden olduğu ve hastalık patogenezisinde önemli katkıları olduğu bildirilmiştir (Lu vd., 2014; D. Yang vd., 2010).

HMGB1 (sinir sistemi konseptinde kullanılan diğer isimleri ile p30, heparin bağlayan protein, amphoterin veya sulfoglukoronil karbonhidrat bağlayan protein-SBP-1) nüklear bir komponenttir ve nükleusta B tip DNA'nın minör yarığına

bağlanarak, bazı steroid hormon reseptörleri, p53, NF-κB, protein veya TBP içeren homebox'ların transkripsiyonel aktivasyonlarını düzenler. Bunun dışında HMGB1'in anti-apoptotik özelliği vardır ve UV, CD95, TRAIL, caspase8 ve Bax ilişkili apoptozisi önlediği bildirilmektedir (Merenmies vd., 1991; Zayed vd., 2003).

HMGB1'in hücre kompartmanları arasında geçişi söz konusudur. HMGB1'in majör tipi nukleusta bulunan tiyol izoformudur. Bu, nekrozda salınan temel izoform olup kemokin benzeri görev yaparak nekroza uğrayan bölgelere yangı hücrelerini çeker. İkinci izoformu disülfit-HMGB1, proinflamatuvar sitokin benzeri bir moleküldür; sitokin ve diğer yangısal mediatörlerin salınması için monosit/makrofajları ve diğer hücreleri aktive eder. Üçüncü izoformu ise okside-HMGB1'dir ve görevi anlaşılamamakta beraber yangısal olaylarla ilişkisinin olmadığı ifade edilmektedir (Andersson vd., 2014).

HMGB1 primer olarak aktive olmamış hücrelerde nukleusta bulunur, fakat PRR'ların aktive olması ile birlikte dakikalar içerisinde sitoplazmada birikir. Nuklear HMGB1 aktif olarak ve sürekli nuklear membrandaki özel porlar aracılığı ile sitozolden nukleusa girip çıkar. Sitoplazmada HMGB1 oranı, spesifik lizin kalıntılarının asetilasyon durumu ile belirlenmektedir (Andersson vd., 2014; Lu vd., 2014). Enfeksiyon veya hasar sırasında aktive olan immün hücreler ve hasarlı hücreler tarafından ekstrasellüler boşluğa salınır, burada HMGB1 proinflamatuvar medyatör olarak fonksiyon görerek, yangısal hastalıkların patogenezisine katkı yapar (Lu vd., 2013). HMGB1'in nukleustan sitoplazmaya translokasyonun mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, bu geçişe inflamazomların (Lu vd., 2013) ve JAK/STAT1 uyarımının (Lu vd., 2014) neden olduğu gösterilmiştir. HMGB1'in ölü, ölmekte olan ya da hasarlı hücrelerin nukleusundan salınımı pasif yolla olurken, aktif salınımı immün hücrelerce olmaktadır (Yu vd., 2015). HMGB1'in aktif sekresyonu aşırı sitoplazmik birikime bağlı olup, endolizozomal kompartımanlarda izole edilerek ekstrasellüler boşluğa salınır (Musumeci vd., 2014).

Bir kez salındığı zaman HMGB1, RAGE (receptor for advanced glycation end-products) ile TLR2 (toll-like receptor2) ve TLR4 reseptörlerine bağlanarak TNF-α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokin salınımına ve ekspresyonuna yol açar (Andersson vd., 2000). RAGE, HMGB1 için primer reseptör olarak kabul edilir ve RAGE insan ve farelerde MHC kompleks yakınında yerleşmiş, immunoglobulin superfamilyası üyesi olarak kabul edilen bir gendir. RAGE nöron, endotel hücreler, düz kas hücreleri,

monositler, makrofajlar ve immature dendritik hücrelerde bulunmaktadır (Andersson vd., 2000; Ulloa ve Messmer, 2006).

HMGB1 nötrofiller dahil çekirdekli hücrelerin membran bütünlüğünün bozulması sonucu nekrozu neticesinde pasif olarak ekstrasellüler boşluğa salınır (Yang vd., 2009). Mononükleer fagositler de çeşitli PAMP veya proinflamatuvar sitokin gibi aktivatörlerle temasta HMGB1 oluştururlar. Bununla birlikte HMGB1'in aktif lökositlerce salınımı klasik Golgi ve endoplazmik retikulum bağımlı sekresyon yolağından farklı bir yolla olur. Bu süreç nükleusta HMGB1'in 43 lizin rezidülerinin çoğunun asetilasyonu ile birlikte nükleustan endolizozomlara geçişini ve sonrasında eksositozu takip eder (Musumeci vd., 2014; Yang vd., 2009). Ekstrasellüler HMGB1, antijen sunan hücreler için, özellikle makrofajlar ve dendritik hücreler için bir aktivatör veya sitokin gibi görev yaptığı bildirilmektedir (Dumitriu vd., 2007; Yang vd., 2009; D. Yang vd., 2010). Yapılan bir çalışmada nötrofil degranülasyonu veya ölümü sonucu salınan HMGB1 gibi alarminlerin, nötrofil lökositler ile dendritik hücreler arasında bağlantı kurarak, doğal ve kazanılmış immüniteyi uyardığı belirlenmiştir (Yang vd., 2009).

2.9.1. MSS'nin gelişiminde ve hastalıklarında HMGB1 proteinin rolü

HMGB1'in omurgalıların sinir sistemi hücrelerinde iki farklı şekilde görev aldığı ortaya konulmuştur. Bunlar; nükleer "mimari" faktör olarak ontojenik gelişimi teşvik etmesi ve salgılanan bir inflamatuvar faktör olarak nöroinflamasyonda görev almasıdır. Erken beyin gelişimi sırasında HMGB1, merkezi sinir sisteminde karmaşık bir zamansal dağılım modeli gösterir. Ön beyin gelişimi gibi süreçler için kritik olan nörit büyümesini ve hücre göçünü kolaylaştırır. Yetişkinlik döneminde, HMGB1, omurilik ve beyindeki hasardan sonra nöroinflamasyonu indüklemeye hizmet eder (Fang vd., 2012).

HMGB1 esas olarak nöronlar ve glial hücreler de dahil olmak üzere tüm hücre tiplerinde ifade edilir. TBI (Travmatik beyin hasarı) (Okuma vd., 2012), subaraknoid kanama (SAH) (Haruma vd., 2016), epilepsi (Fu vd., 2017), alzheimer hastalığı (AD) (Fujita vd., 2016), amyotrofik lateral skleroz (ALS) (Coco vd., 2017; Paudel vd., 2020), parkinson hastalığı (PD) (Sasaki vd., 2016) gibi çeşitli nöroinflamatuvar koşullarda hücre dışı HMGB1'in aşırı ekspresyonu gözlenmiştir. Salgılanan HMGB1 seviyeleri, nöronların apoptozisi ve nekrozu ile korelasyon göstermektedir (Kawabata vd., 2010). Ayrıca, TBI (Gao vd., 2012), SAH sonrası erken beyin hasarı (EBI)

(Haruma vd.,2016), serebral iskemi ve hipoksik iskemi (HI) (Chen vd.,2019) gibi çeşitli beyin hasarı tiplerinde HMGB1 aracılı nöroinflamatuvar yanıt şekillendiği belirlenmiştir.

Deneysel TBI indüksiyonunun yapıldığı bir çalışmada, HMGB1'in artan ekspresyonunun görülmesinin yanında, TBI'den sonra ikinci hasara yol açan nöroinflamatuvar yanıtı yönlendirdiği de ortaya konulmuştur. TBI, HMGB1'in nükleositoplazmik translokasyonu ile ekstraselüler ortama salınmasını indükler. Hücre dışı HMGB1, kısmen oksitlenip, HMGB1'in disülfid formunu oluşturabilir. Disülfid HMGB1, daha sonra TLR4 (Toll benzeri reseptör 4) ve RAGE reseptör sistemine bağlanır. Bu da MD-2 (Miyeloid farklılaşma faktörü-2) ile etkileşime girer ve MyD88'e (Miyeloid farklılaşma yanıt proteini 88) bağlı yolağı başlatır. Aynı zamanda ERK (Hücre dışı sinyalle ilgili kinaz) yolağını başlatmak için Ras'a bağlanır. HMGB1-TLR4 eksenini, hem doğrudan hem de TRAF6 (TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6) aracılığıyla NF- κ B sinyalini etkinleştirebilir. Bu yollar nihayetinde NF- κ B ile etkileşime girer ve birkaç pro-inflamatuvar sitokin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) üreterek nöroinflamatuvar yanıtın oluşmasına yol açar. Bu şekilde, HMGB1, aşırı nöroinflamasyon ile birlikte, M1 polarizasyonu, apoptozis, oksidatif hasar, beyin ödemi, artan KBB geçirgenliği yollarıyla TBI kaynaklı ikincil hasara aracılık edebilir (Webster vd., 2019a; 2019b).

2.10. RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products)

HMGB1, birden fazla reseptör aracılığıyla sinyal verir. Bugüne kadar, belki 15'ten fazla farklı HMGB1 reseptörü tanımlanmıştır. Bazıları HMGB1 ile doğrudan etkileşime girer (RAGE, TLR4 / MD-2, TIM3 vb. gibi) ve bazıları HMGB1'in sinyal yolunu açmak için diğer moleküller veya komplekslerle etkileşime giren karmaşık ligandlara ihtiyaç duyarlar (Ugrinova ve Pasheva, 2017).

RAGE, gelişen sinir sisteminde nörit büyümesinde rol oynayan amfoterin bağlanma reseptörü olarak tanımlanan ilk HMGB1 reseptörüdür (Hori vd., 1995). Adından da anlaşılacağı gibi, RAGE, gelişmiş glikasyon son ürünlerini (AGE'ler) bağlar. Ancak yakın zamanda, çoklu fizyolojik ve patolojik süreçleri düzenleyen moleküller olan HMGB1, S100 ailesi üyeleri, amiloid- β peptid, DNA, RNA ve diğerleri dahil olmak üzere yapısal olarak farklı moleküllere bağlandığı açıklanmıştır. RAGE, immünooglobulin gen süper ailesine aittir. Hücre dışı bir alan, kısa bir zar geçiş alanı ve 43 amino asitli bir sitoplazmik kuyruktan oluşur. HMGB1 kaynaklı RAGE

aktivasyonu, sepsis, kanser, romatoid artrit, diyabet ve diyabetik nefropati, ateroskleroz ve nörolojik bozukluklar gibi çeşitli hastalıklara katkıda bulunduğu ortaya konulmuştur (Kang vd., 2014; Ugrinova ve Pasheva, 2017).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada *Listeria spp.* ile doğal olarak enfekte, 15 adet koyunun beyinlerine ait arşiv materyalleri kullanıldı. Bu materyaller, çalışmanın yürütüleceği Ondokuz Mayıs Üniversitesini, Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ile Tarım ve Orman Bakanlığı, Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü, Patoloji Laboratuvarı arşivinden sağlandı. Çalışma, listerik ensefalitiste lezyonların en belirgin olduğu beyinin rombensefalon (pons, medulla oblongata) bölgesine ait kesitlerde yürütüldü. Parafin bloklar hazırlanırken, hayvanlara ait anemnez bilgileri ve diğer bulguları kayıtlardan çıkarıldı ve olgular numaralandırıldı. Bu işlem sırasında *Listeria spp.*'nin varlığı konvansiyonel mikrobiyoloji, PCR veya immunohistokimya ile doğrulanmış olgular öncelikli olarak kullanıldı. Laboratuvar kayıtlarına göre; bakteriyolojik olarak yalnızca 10 nolu olguda *L. grayi*, 11 nolu olguda *L. ivonovi* izole edilmiş olup, diğer olgularda bakteriyolojik değerlendirme yapılamamıştır. Hastalığın doğrulanması büyük oranda *Listeria spp.* için uygulanan immunohistokimyasal boyamalar ve tipik histopatolojik bulgulara göre yapılmıştır.

Herhangi bir enfeksiyöz ya da sinir sistemiyle ilişkili bir hastalığı olmayan, normal 5 adet koyuna ait rombensefalon bölgesi kontrol olarak tutuldu ve enfekte beyinlere yapılan işlemler, aynı şekilde bu beyinlerde de uygulandı.

3.2. Metot

3.2.1. Histopatolojik İnceleme

Listeria pozitif olgulara ait arşivsel bloklardan mikrotom (Leica) ile 4-5 µm kalınlığında alınan kesitler, rutin prosedürle hematoksilin-eozin ile boyandı. Bu amaçla alınan kesitler önce ksilolde deparafinize edildi, ardından absöüt, %96 'lık, %80'lik ve %70'lik alkollerden geçilip rehidre edildikten sonra Mayer's hematoksilin ile boyandı. Kesitler akan musluk suyu ile yıkanıp asit alkolle muamele edilerek boyanın fazlası giderildi. Distile suda yıkama işlemini takiben, kesitler eozin ile boyanıp seri alkollerden ve ksilolden entellan ile kapatıldı. Hazırlanan preperatlar Nikon Eclipse E600W ışık mikroskopunda incelendi.

Gözlenen lezyonlar Oeverman vd. (2010) ve Di Palma (2012) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre nicelik olarak 3 aşamada değerlendirildi:

1. Lezyonlar süresine göre: Tip 1-mikroapseler: nötrofillerin daha baskın olduğu lezyonlar (akut ensefalitis); Tip 2-mikroapseler: makrofajların baskın olduğu, bazen çok çekirdekli dev hücrelerinin bulunduğu lezyonlar (kronik ensefalitis); Tip 3mikroapseler: Tip 1 ve Tip 2 lezyonların karışımından ibaret olan lezyonlar (subakut ensefalitis) olarak ayırımları yapıldı. Olguların değerlendirilmesi, baskın olan forma göre rölatif olarak yapıldı. Diğer iki aşama bu grupta sınıflandırılan kesitlere göre değerlendirildi.

2. Mikroapseler büyüklüğüne göre: 0= mikroapse yok, 1=tek küçük apse, 2=birkaç küçük ve büyük mikroapseler, 3=orta derecede birleşen mikroapseler, 4=çok sayıda parankimi geniş alan halinde tutan mikroapseler olarak sınıflandırıldı,

3. Perivasküler (PV) hücre infiltrasyonu yapısına göre: 0= yok, 1=tek hücre katı halinde infiltrasyon, 2=iki tabakalı perivasküler hücre infiltrasyonu, 3=üç veya dört kat halinde perivasküler hücre infiltrasyonu, 4=dört katmandan daha çok sıralı perivasküler hücre infiltrasyonu şeklinde derecelendirildi.

Ayrıca nöronal nekroz, ödem, nöronofaji, fokal gliozis, aksonal sferoidler ve meningitis gibi diğer lezyonların varlığı semi-kantitatif olarak değerlendirildi.

3.2.2. İmmunohistokimyasal İnceleme

3.2.2.1. İmmunoperoksidaz Yöntem

İmmunoperoksidaz teknik, beyin dokusunun bazı bölgelerinde HMGB1 ekspresyonunu belirlemek üzere kullanıldı. HMGB1 ekspresyonu için histopatolojik olarak değerlendirilen olgularda ve kontrol hayvanlarda HMGB1 ekspresyonlarını belirlemek üzere, ilgili bloklardan 3-aminopropiltrioksilan (APES) kaplı adeziv özellik kazandırılmış lamlara 6 µm kalınlığında ilave kesitler alınarak streptavidin-biotin peroksidaz kompleks (SABPK) tekniği ile boyanmıştır.(Schmidt vd., 2014). Bu tekniğe uygun olarak ilgili belirteçlere karşı ticari olarak bulunan ve Tablo 3.1 de gösterilen antikolar kullanıldı. Bu amaca uygun olarak streptavidin-biotin immunohistokimya kiti (invitrogen, cat no:85-9043, HRP) kullanıldı ve test yöntemi ilgili firmanın direktifleri doğrultusunda sürdürüldü. Parafin bloklardan APES kaplı lamlara alınan kesitler, önce iki kez ksilende 10'ar dakika bekletilerek parafini giderildikten sonra, sırasıyla absolüt alkol, % 96 ve % 70'lik alkol serilerinden geçirilerek rehidre edildiler. Tüm aşamalar nemli ortamda ve/veya oda ısısında gerçekleştirildi. Tüm yıkama aşamalarında fosfat tamponu (pH 7,4) kullanıldı.

Endojen peroksidaz aktivitesi metanoldeki %3'lük H₂O₂ ile 10 dk. bekletilerek giderildi. Kesitler, formalin solüsyonuna ve arşivdeki bekleme süresine bağlı olarak inaktive olmuş antijenik yapıyı açığa çıkarmak üzere ve antikörlerin kullanım tekniğine göre tablo 3.1.'de belirtilen uygun antijen açığa çıkarma yöntemleri uygulandı. Buna göre sitrat tamponlu (pH 6) antijen açığa çıkarma solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında 800 watt'da 20 dk. tutulduktan sonra soğumaya bırakıldılar. Spesifik olmayan antijenik bağlanmaları engellemek için kesitler %10'luk keçi serumunda 10 dk. muamele edildikten sonra tablo 3.1'de adı geçen primer antikörler ile +4 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün PBS ile 3x5 dk yıkamayı takiben kesitler kit kapsamında bulunan sekonder antikörle 20 dk. muamele edildi. Kesitler PBS ile 3x5 dk yıkandılar ve 20 dk. süreyle peroksidaz enzimi konjuge streptavidin ile inkübe edildiler. Tekrar PBS ile 3X5 yıkama sonrası 3-amino-ethyl-carbazole (AEC) kromojeni ile 5 dk. (mikroskop altında kromojenin reaksiyonu kontrol edilerek) boyanarak antijenler görünür hale getirildi. Son olarak kesitler Mayer's hematoksilen ile 1-2 saniye karşıt boyamaları yapılarak musluk suyu ile yıkandı ve su bazlı immun yapıştırıcı (Thermo) ile kapatıldı.

Tablo 3.1. İmmunohistokimyasal (SABPK) boyamalarda kullanılan antikörler ve özellikleri

Antikör (Klon)	Konakçı	İzotip	Antikör türü	Antijeni açığa çıkarma yöntemi	Sulandırma oranı	Üretici firma
Anti-Listeria monocytogenes	tavşan		poliklonal	Uygulanmadı	1:2000	TO Bakanlığı BVKE
Anti-human HMGB1	tavşan	IgG	poliklonal	Sitrat tamponlu (pH 6) solusyonda Mikrodalga fırında 800watt 20 dk	1:250	Novus Biologicals Cat no: NB100-2322

3.2.2.2. İkili İmmunofloresan Yöntem

HMGB1 ekspresyonunun hangi hücrelerde ne oranda ifade edildiğini ve subsellüler lokalizasyonunu belirlemek üzere ikili immunofloresan boyama tekniği kullanıldı. Bu immunofloresan teknik için, her koyuna ait beyinin rombensefalon bölgesine ait dokulardan alınan seri kesitler üzerinde Tablo 3.2'de özellikleri gösterilen sinir sistemi ve infiltre olan hücreler için mevcut ticari antikörler kullanıldı. Aynı konakçıda hazırlanmış iki farklı birincil antikör kullanımı için ihcword (Immunofluorescence Double Staining Protocol) tarafından önerilen prosedür uygulandı.

Bunun için, Olig2 (Oligodendrosit), GFAP (astrozit) ve CD11b (aktif mikroglia) antikoları ile HMGB1'nin ikili immunfloresan boyamaları yapıldı. Kesitler özgül olmayan antijen-antikor reaksiyonlarını engellemek için protein bloklama solusyonunda 10 dakika tutuldular. HMGB1 için primer antikor ile inkubasyona bırakılan kesitlere daha sonra bu primer antikora özgü ve rodamin ile işaretli sekonder antikor ile karanlık ortamda inkübe edildi ve bu aşamadan sonra tüm inkubasyonlara karanlık ortamda devam edildi. Mikroskopta HMGB1 boyanması kontrol edildikten sonra ikinci primer antikor inkübasyonu aşamasına geçildi. Öncelikle ikinci sekonder antikorun hazırlandığı hayvana ait serumda protein bloklama yapıldı. Bu aşamayı takiben kesitler ikinci primer antikoların (Olig2, GFAP ve CD11b) inkubasyonları ile devam edildi ve bunlar için de FITC (Fluorescein isothiocyanate) ile işaretli ikinci bir sekonder antikor kullanıldı. FITC boyamaların kontrolleri mikroskobun uygun filtresi kullanılarak yapıldı. Bu işlemi takiben kesitlerde DAPI ile çekirdek boyamaları yapıldı ve anti-fade yapıştırıcı ile kesitlerin üzeri kapatılarak ve floresan eklentili mikroskopta (Nikon Eclipse E600) incelendi. Protein bloke edici serumu ile inkubasyon aşaması hariç tüm işlemlerden sonra kesitler 2 kez 5 dakika süreyle PBS+Tween20 solüsyonu ile yıkama yapıldı. Kesitlerde aynı bölgede/hücrede farklı floresan boya ile boyanan alanlar fotoğraflanıp, Photoshop programında birleştirildi. İmmunofloresan görüntüler birleştirildikten sonra elde edilen fotoğraflar değerlendirilmeye hazır hale getirildi.

Tablo 3.2. İkili İmmunfloresan boyamalarda kullanılan primer ve sekonder antikolar ve özellikleri

Antikor (Klon)	Konakçı	İzotip	Antikor türü	Antijeni açığa çıkarma yöntemi	Sulandırma oranı	Üretici firma
Anti-human HMGB1	tavşan	IgG	poliklonal	Sitrat tamponlu (pH.6) solusyonda mikrodalga fırında 800watt 20 dk	1:250	Invitrogen Cat no:PA1-16926
Anti-rabbit OLİG2	tavşan	N/A	poliklonal	Tris-Edta (pH.9) solusyonda mikrodalga fırında 800watt 20 dk	1:500	Millipore Cat no: AB9610
Anti-bovine GFAP	tavşan	IgG	poliklonal	Sitrat tamponlu (pH.6) solusyonda mikrodalga fırında 800watt 20 dk	1:100	Novus Biologicals Cat no:NB120-16997
Anti-human CD11b	keçi	IgG	poliklonal	Sitrat tamponlu (pH.9) solusyonda mikrodalga fırında 800watt 20 dk	1:250	Abcam Cat no: AB62817

Rodamin işaretli anti-rabbit sekonder antikor	keçi	IgG	poliklonal	-	1:200	Invitrogen Cat no: 31670
Anti-rabbit FITC işaretli sekonder antikor	keçi	IgG	poliklonal	-	1:200	Abcam Cat no: AB7086
Anti-Goat FITC işaretli sekonder antikor	eşek	IgG	poliklonal	-	1:100	Abcam Cat no: AB7121

3.3. İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Analizi

HMGB1 antijenin immunoreaktivitesi ve Listeria antijeninin immunohistokimyasal dağılımı yanında Olig2 (oligodendrosit), GFAP (astrozit) ve CD11b (mikroglia) gibi hücre belirteçleri ile HMGB1'in ikili immunofloresan boyama sonuçları semi-kantitatif olarak değerlendirildi.

Derecelendirmede incelenen fotoğraflardaki pozitif hücre ve alanlar baz alınarak analiz için yüksek yoğunlukta reaksiyon gösteren alanlar rastgele seçildi. Rastlantısal 10 mikroskop sahasında pozitif boyanan hücreler sayılarak puanlama yapıldı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Doku kesitlerinde, HMGB1 ve hücre belirteçleri ile yapılan tekli immunoperoksidaz ve ikili immunofloresan boyamaların incelemeleri sonucunda alınan subjektif veriler tablo 3.3' teki gibi 0-3 arasında puan verilerek sayısal verilere dönüştürüldü.

Tablo 3.3. İmmunohistokimyasal sonuçların değerlendirilmesi

HMGB1 pozitif hücre Sayısı	0	≤%10	%10-50	≥%50
Puan	0	1	2	3

Ayrıca HMGB1'in ikili immunofloresan boyamalarda hücrelerin subsellüler lokalizasyonları negatif=0, çekirdekte=Ç, sitoplazmada=S, ekstrasellüler=E olarak değerlendirildi ve histopatolojik bulgular ile korelasyonları karşılaştırıldı. Alınan

mikrofotoğraflardan HMGB1 immunopozitifliği ile bunların seri kesitlerindeki histopatolojik bulguların korelasyonları için görüntü analiz sistemi kullanılarak (Bs200Pro Görüntü Analiz Sistemi, BAB software, Ankara, Türkiye), sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen histopatolojik, immunohistokimyasal ve immunfloresan bulgular Nikon DS-5M kamera ataçmanlı Nikon Eclipse E600W ışık mikroskobu yardımıyla görüntülendi ve mikroskobik fotoğrafları çekildi. Elde edilen sayısal veriler Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA, 2007) istatistik analiz programı kullanılarak değerlendirildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen parametreler için parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Hangi gruplar arasında önemliliğin olduğunu belirlemek amacıyla Mann-Whitney U testi yapıldı. Ancak gruplar arası sayı farkının belirgin olduğu durumlarda eşitsiz varyans t testi (Welch'in t testi) yapıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında $P < 0,05$ değeri önemli olarak kabul edildi.

Histopatolojik veriler ile HMGB1 pozitif hücreler arasında korelasyonların hesaplanmasında parametrik olmayan Spearman korelasyon analizi kullanılmış olup, tüm analizlerde yine Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA, 2007) istatistik analiz programından yararlanılmıştır ($p < 0,05$ anlamlı kabul edildi).

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

Olguların tümüne genel olarak bakıldığında mikroskopik lezyonların belirgin olarak beyin kökünde şekillenmekle birlikte, en şiddetli lezyonlar medulla ve ponsta daha az olarak rostralde talamus, kaudalde spinal kordun servikal bölgesinde görüldü. Bu lezyonlar çoğunlukla mikroapseler ile karakterizeydi. Bunun dışında aralarında az sayıda nötrofil lökositin olduğu yoğun perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları hastalığın tipik bulguları arasında gözlemlendi. Bazı olgularda meninkslerde (olgu no 1, 6, 9) yoğun perivasküler hücre infiltrasyonlarına rastlandı.

Olgulara göre bulguların sınıflandırılması Tablo 4.1’te ayrıntılı olarak verilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre seçilen olgulardan 6 adedi akut, 4 adedi kronik ve 5 adedi subakut ensefalitis olarak değerlendirildi.

Tablo 4.1. Koyunlara ait listerik ensefalitis olgularının histopatolojik sınıflandırılması

Olgu No	Lezyon Süresine göre			Mikroapse büyüklüğüne göre					Perivasküler Hücre İnfiltrasyonu yapısına göre				
	Tip 1 (akut)	Tip 2 (kronik)	Tip 3 (subakut)	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
1	✓						✓				✓		
2	✓						✓				✓		
3		✓				✓							✓
4	✓						✓				✓		
5		✓						✓				✓	
6		✓				✓							✓
7	✓					✓					✓		
8	✓							✓			✓		
9			✓					✓				✓	
10	✓						✓					✓	
11			✓			✓						✓	
12			✓			✓						✓	
13		✓					✓					✓	
14			✓					✓					✓
15			✓			✓						✓	

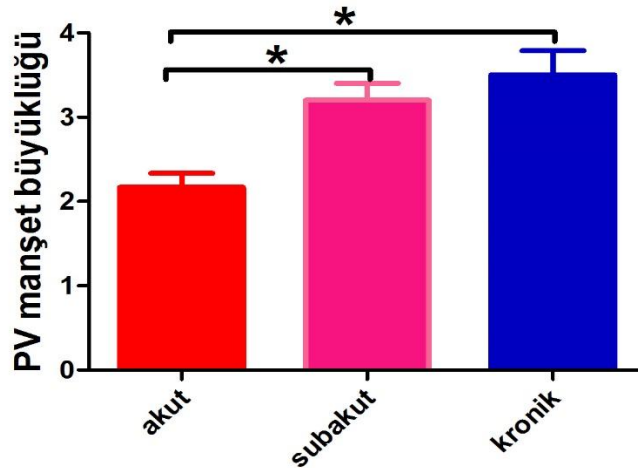
Akut olgulardan 4’ünde (olgu no; 1, 2, 4, 10) orta derecede birleşen mikroapseler olarak (histopatolojik değerlendirmede yer alan mikroapse büyüklüğüne göre 3. şiddette) kaydedildi. Bir olguda (olgu no;8) çok sayıda ve parankimi geniş alan halinde

tutan mikroapsellerle karakterize lezyonlar (4 şiddette) görüldü. Bir olgu (olgu no; 7) ise, birkaç küçük ve büyük mikroapse (2 şiddette) varlığı şeklinde değerlendirildi (Şekil 4.2).

Subakut ve kronik olgularda histopatolojik incelemelerdeki mikroapse büyüklüğünün derecelendirilmesi ise farklı şiddet ve yayılımda kendini gösterdi. Subakut beş olgudan ikisinde (olgu no; 9, 14) 4 şiddetinde, üçünde (olgu no; 11, 12, 15) 2 şiddetinde mikroapseler görüldü (Şekil 4.3). Dört kronik olgudan ikisinde (olgu no; 3 ,6) 2 şiddetinde (Şekil 4.4), birinde (olgu no; 13) 3, birinde (olgu no; 5) 4 şiddetinde mikroapse büyüklüğü görüldü.

Olgularda şekillenen bir diğer karakteristik lezyon olan perivasküler hücre infiltrasyonları, yapılarına göre incelendiğinde, olguların tamamında 2-4 şiddetindeydi ve başlıca lenfositler, plazma hücreleri ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücre katmanından oluşmaktaydı.

Enfeksiyonun süresi ile PV manşet büyüklüğü birlikte değerlendirildiğinde akutdan kroniğe manşet kalınlığının arttığı görüldü. Bir diğer ifadeyle enfeksiyonun süresi ilerledikçe perivasküler manşet kalınlığının artmış olduğu belirlendi (Şekil 4.1). Akut ve subakut ile kronik olguların PV manşet büyüklükleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($P<0,05$). Subakut ve kronik olgular arasındaki fark anlamlı düzeyde değildi.



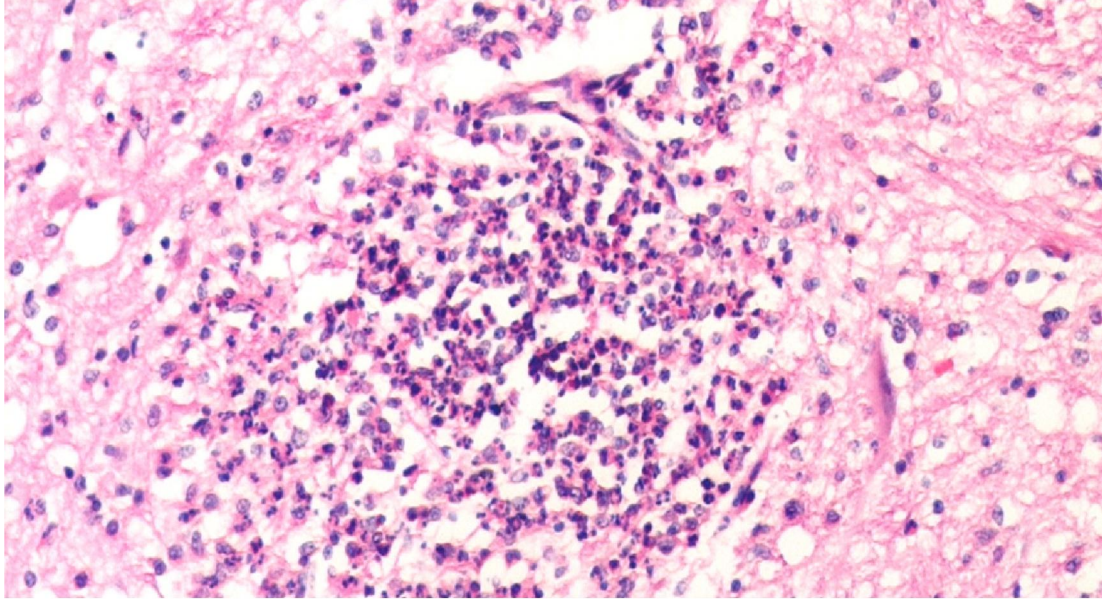
Şekil 4.1. Perivasküler manşet kalınlığının lezyon süresine göre değerlendirilmesi, (* = $P<0,05$).

Altı adet akut olgunun dördünde (Olgular no; 1,4,7,8) 3, ikisinde (Olgular no; 2, 10) 4 şiddetinde perivasküler hücre infiltrasyonları/katmanı görüldü. Subakut olguların ikisinde (Olgular no; 12, 15) 3, ikisinde (Olgular no; 9, 14) 4 şiddetinde görüldü. Dört kronik

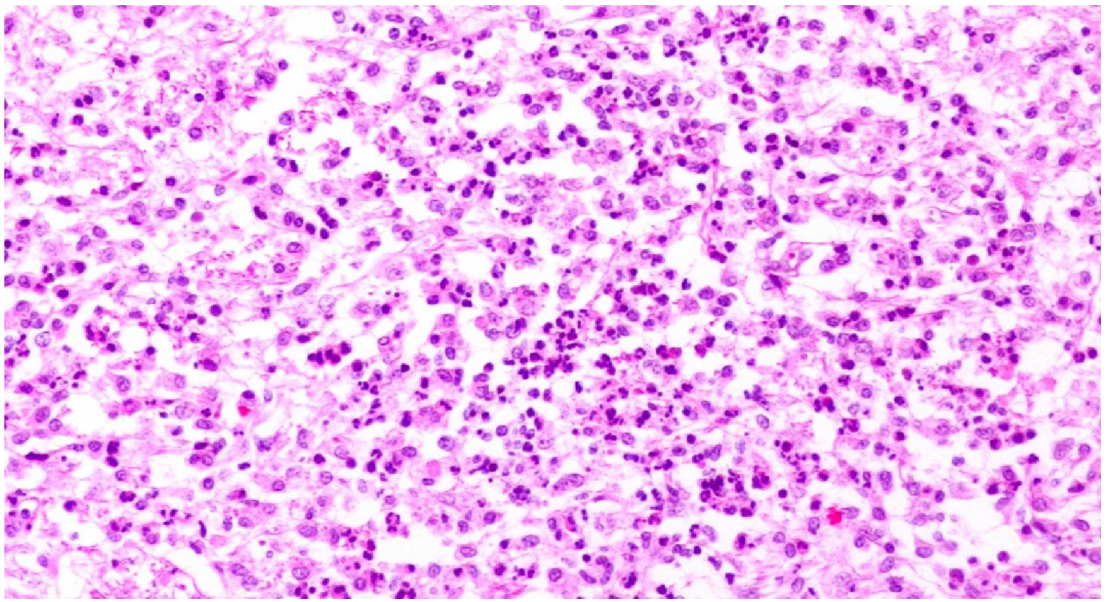
olgudan üçünde (Olgu no; 5, 6, 13) perivasküler hücre infiltrasyonlarının şiddeti 3 olarak belirlendi. Kronik olgulardan yalnızca birinde (Olgu no; 3) 4 şiddetinde, dört katmandan daha çok sıralı perivasküler hücre infiltrasyonu görüldü.

Histopatolojik bulgulardan nöronofaji ve fokal gliosis olguların çoğunda görülmekle birlikte, 7 nolu olguda bu tip lezyonların oranı diğerlerine göre daha belirgindi.

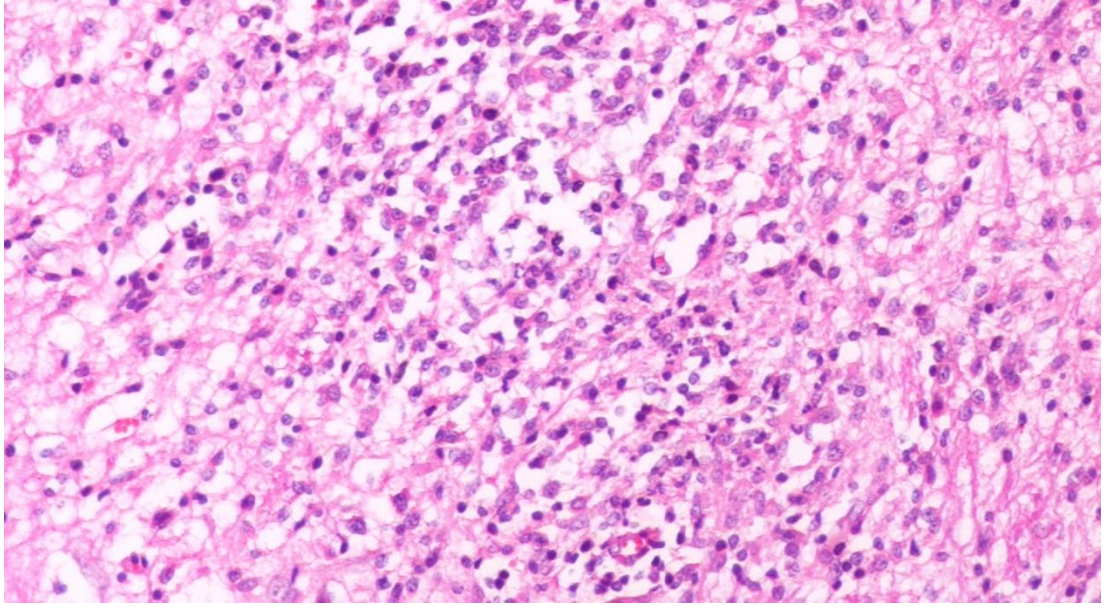
Değerlendirilen 15 adet olguda mikroapse şiddeti ile perivasküler manşetlerin kalınlıkları arasında korelasyon saptanmadı ($r=-0,1703$).



Şekil 4.2. Nötrofillerin yoğun olduğu akut lezyon mikroapse alanı, Rombensefalon, koyun, HxE.



Şekil 4.3. Nötrofil ve mononükleer lökositlerin birlikte bulunduğu subakut lezyon, mikroapse alanı, Rombensefalon, koyun, HxE.

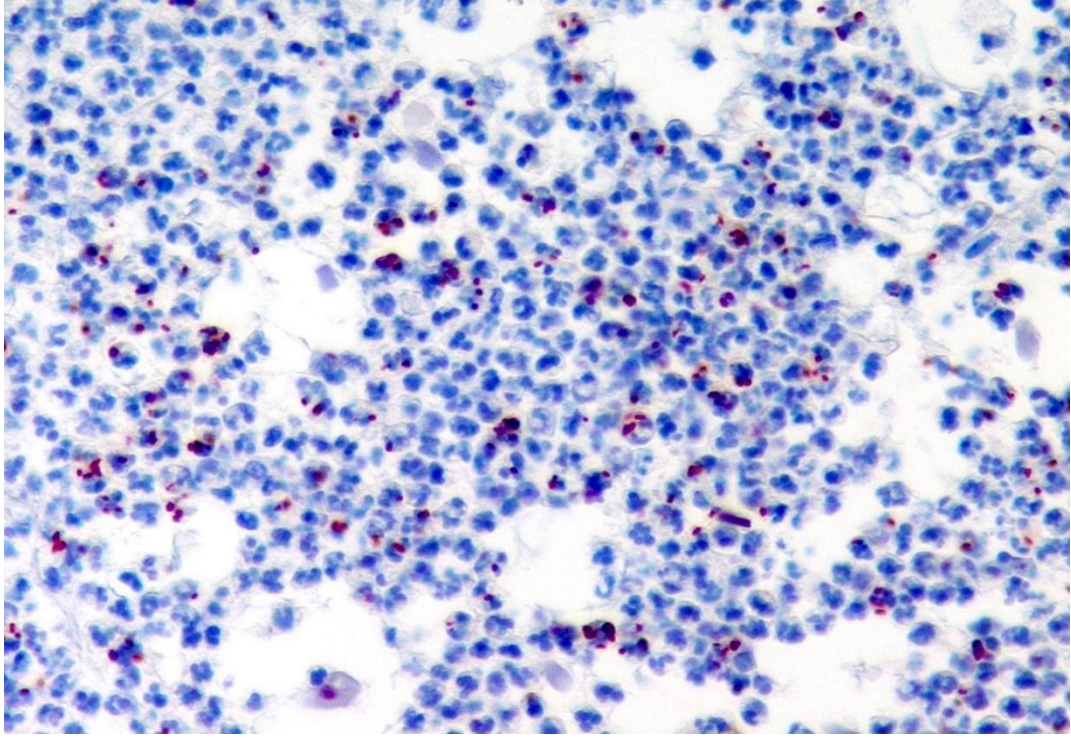


Şekil 4.4. Makrofajların baskın olduğu kronik lezyon, mikroapse alanı, Rombensefalon, koyun, Hx&E.

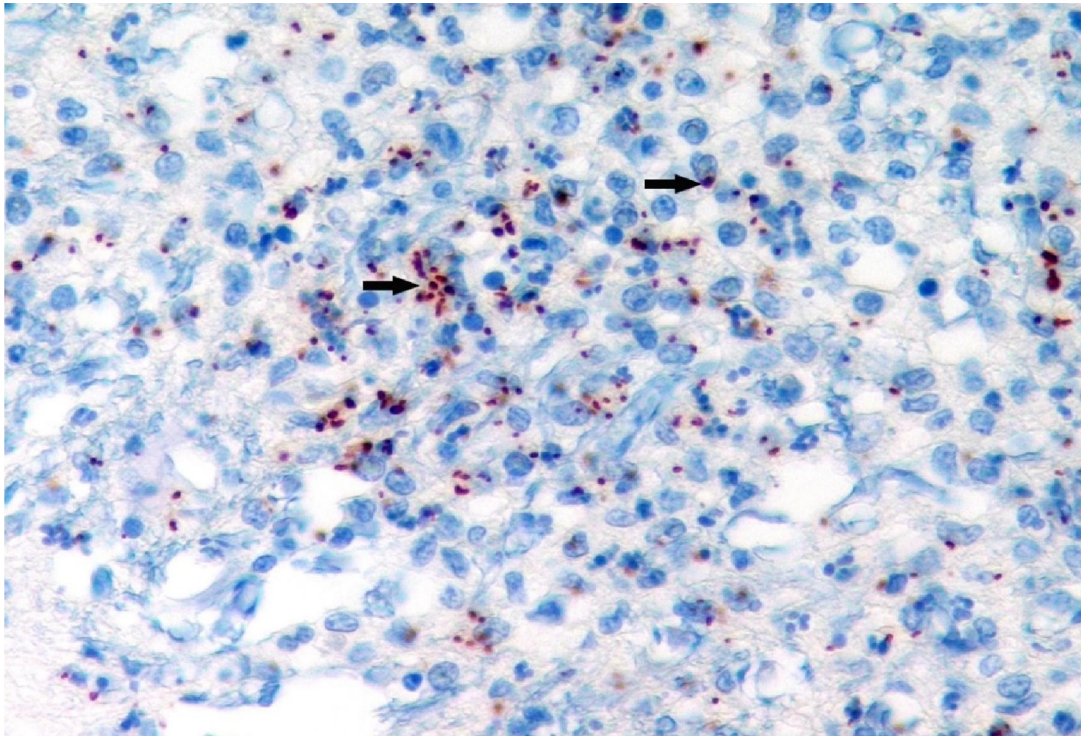
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.2.1. *Listeria* Antijeninin İmmunohistokimyasal Dağılımı

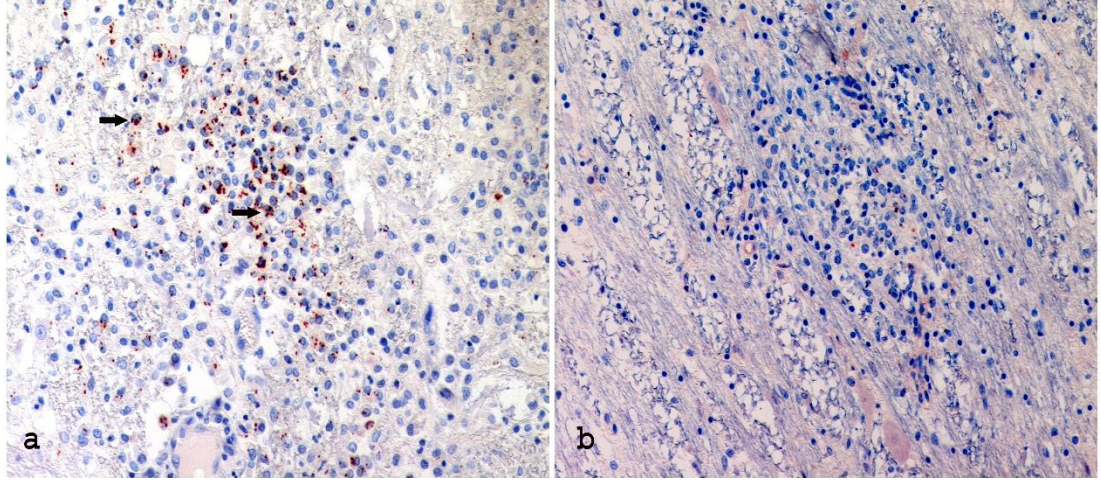
Listeria spp. poliklonal antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda olguların 6 tanesinde (Olgu no; 1, 2, 3, 6, 9, 11) genel olarak mikroapselerde antijen pozitif immunreaksiyonlar gözlemlendi (Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7). Bu lezyonlara ek olarak *Listeria* immunopozitif reaksiyonlara ependimal ve koroid pleksus epitelinde ve daha az olarak bazı nöronların sitoplazmasında da rastlandı (Şekiller 4.8 ve 4.9). Mikroapse yakınındaki perivasküler hücre infiltrasyonlarında hafif ya da negatif immun reaksiyon görüldü (Şekil 4.10a,b,c). Çevresinde yoğun immunreaksiyon varken bir olguda subakut granülamatöz bir odakta negatif immun reaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.10d). İmmunopozitif etkenlerin genellikle kısa çubuk, basil ya da nokta şekilli oldukları, tek tek ya da küme veya gruplar halinde, çoğunlukla nötrofil lökositler ile makrofaj sitoplazmasında, bazen de hücre dışı olarak buldukları dikkati çekti. Bazı kesitlerde immun boyamaların diffuz veya granüler tarzda olduğu gözlemlendi.



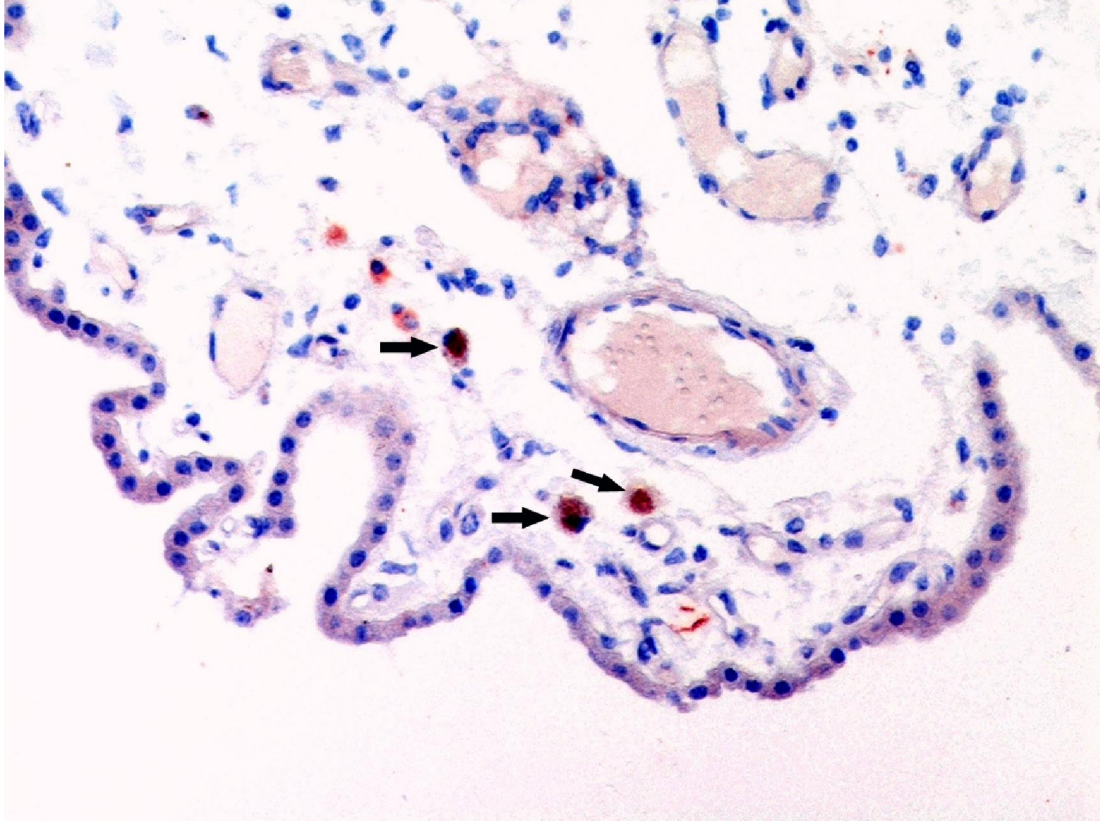
Şekil 4.5. Akut bir lezyonda nötrofillerin sitoplazmalarında ya da hücre dışı yerleşimli, nokta veya kısa çubuk şekilli, immunopozitif *Listeria* antijeni, rombensefalon, koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.



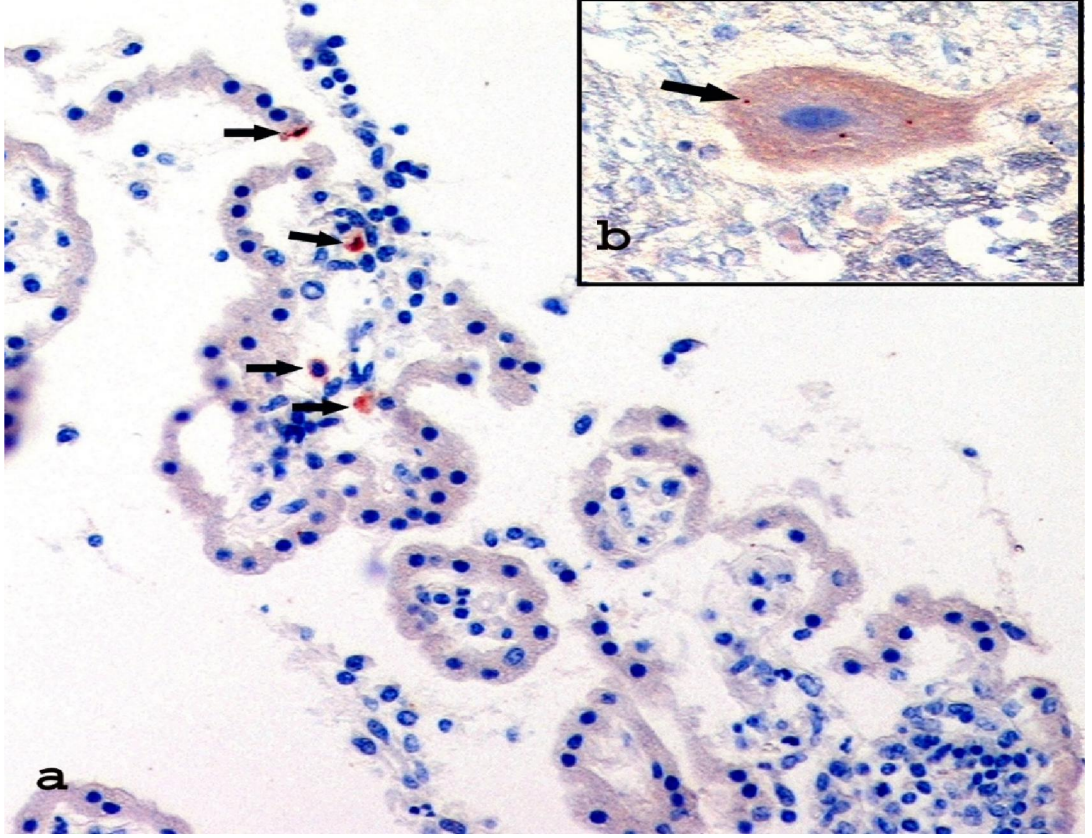
Şekil 4.6. Subakut lezyonda, genellikle makrofajların sitoplazmalarında ya da hücre dışı yerleşimli *Listeria* immunopozitif etkenler (oklar), rombensefalon, koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.



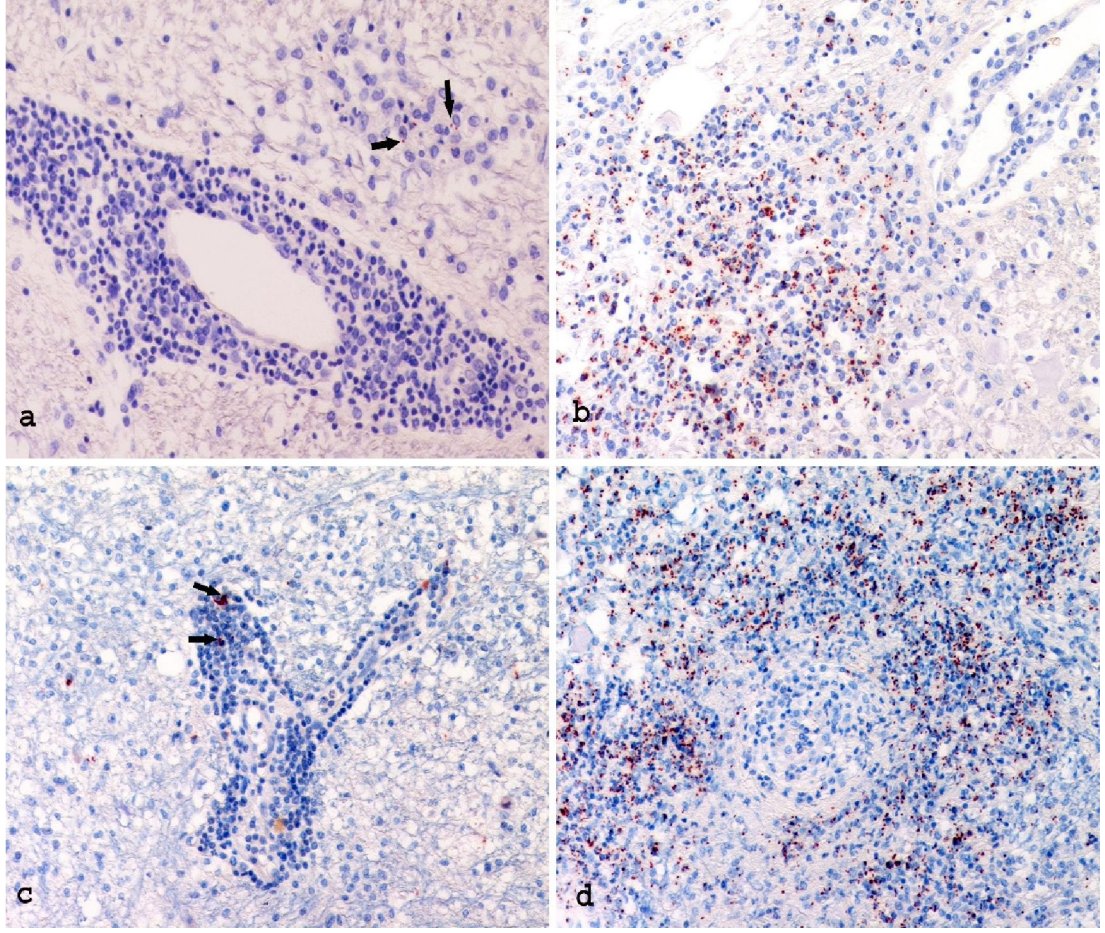
Şekil 4.7. a: Kronik lezyonda şiddetli *Listeria* immunpozitif reaksiyon (oklar). b: Kronik lezyonda hafif immunpozitif reaksiyon, rombensefalon, koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.



Şekil 4.8. Subependimal bölgede bazı makrofajların sitoplazmalarında listerial antijen için granüler tarzda immunpozitif reaksiyon (oklar), Rombensefalon bölgesi (olgu no 3), koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.



Şekil 4.9. a: Koroid pleksus epitelinde ve makrofajlarda Listeria immunpozitif reaksiyonlar (oklar), b: Nöronda nokta şeklinde Listeria immunpozitif reaksiyonlar, Rombosefalon bölgesi, koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.

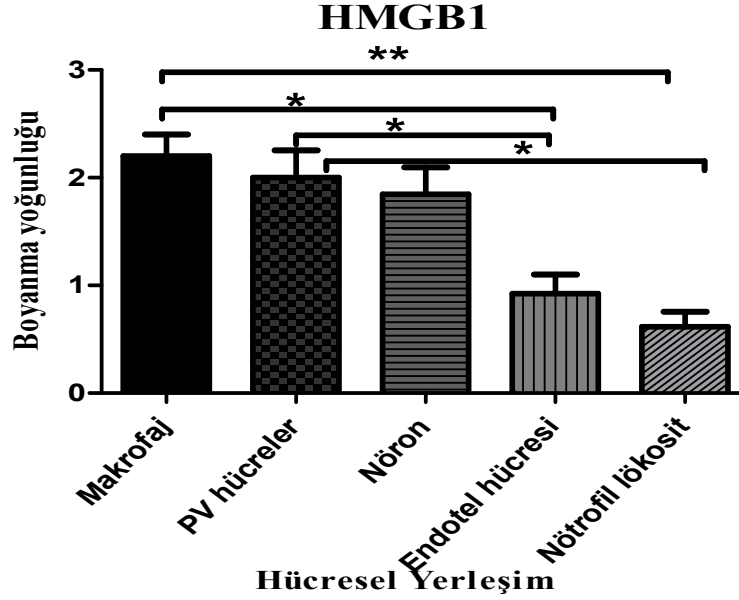


Şekil 4.10. *Listeria* immunopozitifliği, Mikroapse alanında hafif şiddetli (a) veya yoğun (b), immunopozitiflik varken perivasküler hücrelerde antijen immunopozitif hücre bulunmamaktadır. c: perivasküler hücrelerde hafif şiddette immunreaksiyon, d: subakut granülamatöz bir odakta antijen negatif immunreaksiyon, rombensefalon, koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.

4.2.2. HMGB1

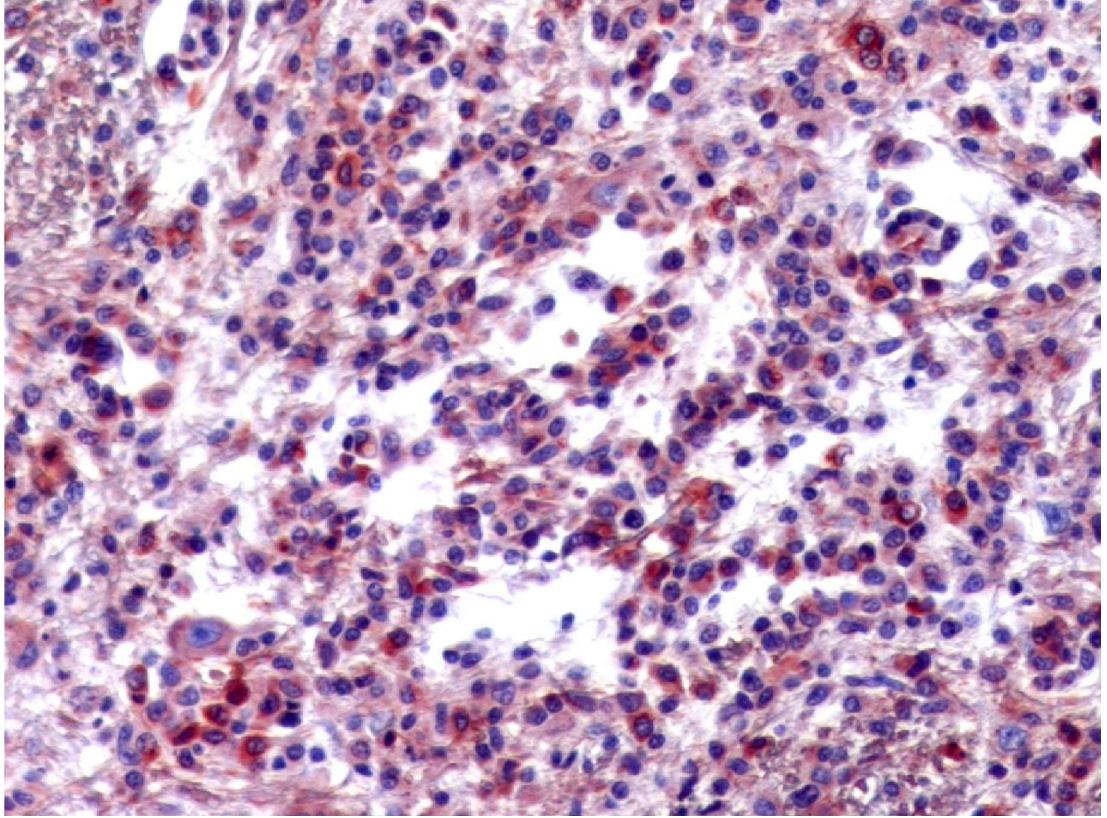
Listerial olgularda rombensefalon bölgesine ait kesitlerde HMGB1 için immunopozitiflik reaksiyonun değerlendirmesi perivasküler hücreler, mikroapse alanlarındaki nötrofil lökositler ve makrofajlar, endotel hücreleri ve nöronlarda semikantitatif olarak yapıldı. Bu değerlendirmeye göre hücre bazında HMGB1 yoğunluğunun karşılaştırılması şekil 4.11'te gösterildi. Buna göre en yoğun immunopozitiflik makrofajlarda görüldü. Değerlendirilen hücre grupları arasında, mikroapselerdeki makrofajlardaki immunopozitiflik skoru, nötrofil lökositlere göre daha yüksek bulundu ve bu iki hücre arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0,0001$). Makrofajlar endotel hücrelerine göre daha yüksek immunopozitiflik gösterdi ve bu iki hücre arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$). PV hücreler genel olarak değerlendirildiğinde nötrofil lökositlere ve endotel hücrelerine göre daha fazla HMGB1 immunoreaktivitesine sahip olduğu

görüldü. PV hücreler ile nötrofil lökositler ve endotel hücreleri arasındaki immunpozitiflik skorları arasındaki fark istatistik olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$). Diğer hücre grupları arasında istatistik olarak anlamlı farklılık görülmedi.



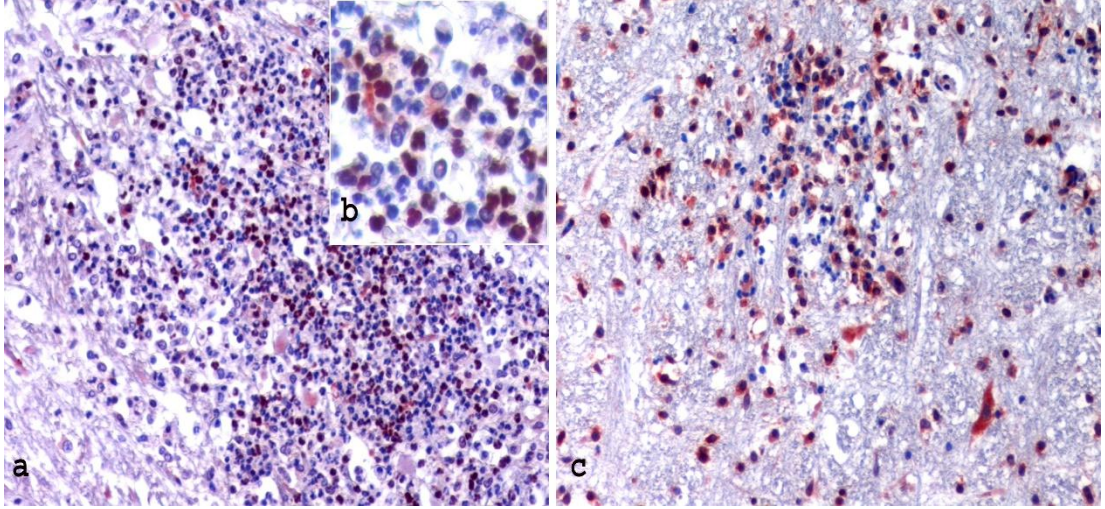
Şekil 4.11. Listeria pozitif olgularda immunohistokimya sonuçlarına göre HMGB1 yoğunluğunun semikantitatif değerlendirilmesi. (* = $P<0,05$; ** = $P<0,0001$).

Mikroapseleri oluşturan hücrelerde subselüler HMGB1 immunoreaksiyonu, nüklear, sitoplazmik ve ekstraselüler olmak üzere üç bölgede gözlemlendi (Şekil.4.12) İmmunohistokimyasal boyamalarda en yoğun HMGB1 immunreaktivitesi mikroapse alanlarındaki makrofajlarda görüldü. Akut ve kronik olgularda makrofajlarda HMGB1 ekspresyonu benzer yoğunlukta ve subakut olgulara göre yüksek düzeyde bulundu. Zamana bağlı olarak makrofajlarda HMGB1 ekspresyonu değerlendirildiğinde, sadece akut olgular ile subakut olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü ($P<0,05$).



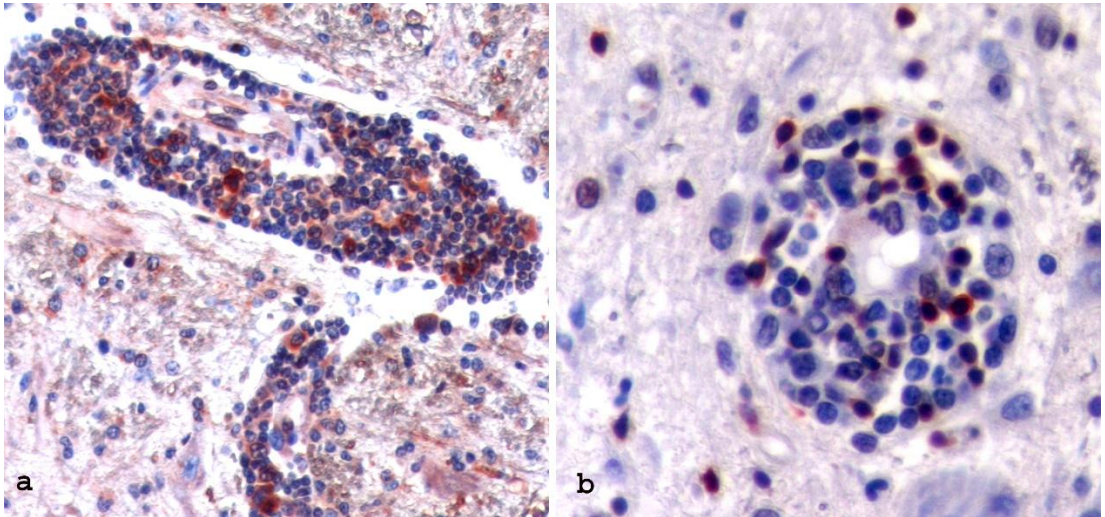
Şekil 4.12. Kronik bir mikroapse lezyonu içerisinde makrofajlarda nüklear, sitoplazmik ve ekstraselüler yerleşimli, şiddetli HMGB1 immunoreaktivitesi, Rombensefalon, koyun SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.

Mikroapse alanlarındaki nötrofillerde HMGB1 ekspresyonu diğer hücelere nazaran oldukça düşük düzeyde görüldü. Mikroapselerdeki nötrofil infiltrasyonları özellikle akut olgularda gözlenirken, immunpozitifliğin çekirdek ve sitoplazmalarında hafif şiddette olduğu dikkati çekti (Şekil 4.13). Akut ve subakut vakalardaki nötrofillerde HMGB1 immunreaktivitesi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P>0,05$).



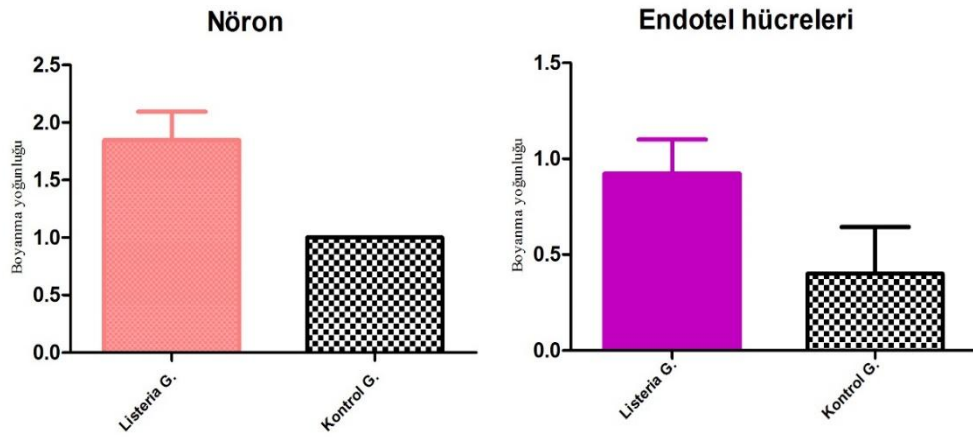
Şekil 4.13. Akut ve subakut mikroapse alanında HMGB1 immunreaktivitesi, a: Akut bir mikroapsede nötrofillerde orta şiddette immunreaktivite, b: Akut mikroapsede nötrofillerde nükleer ve sitoplazmik immunopozitif reaksiyon, c: Subakut mikroapsede nükleer, sitoplazmik ve ekstraselüler alanda immunopozitif reaksiyon, rombenşefalon, koyun, SABPK metod/AEC kromojen, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.

Perivasküler alanlarda görülen HMGB1 immunreaktivitesi, mikroapse alanlarına yakın yoğunlukta görüldü. Boyanmalar intrasitoplazmik ve intranükleer olarak dikkati çekti. En yüksek pozitif skor kronik vakalarda görüldü, bunu sırayla subakut ve akut vakalardaki skor izledi (Şekil 4.14). Lezyon süresine göre yapılan semikantitatif değerlendirmede immunopozitiflik düzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılık olduğu görüldü ($P<0,05$).

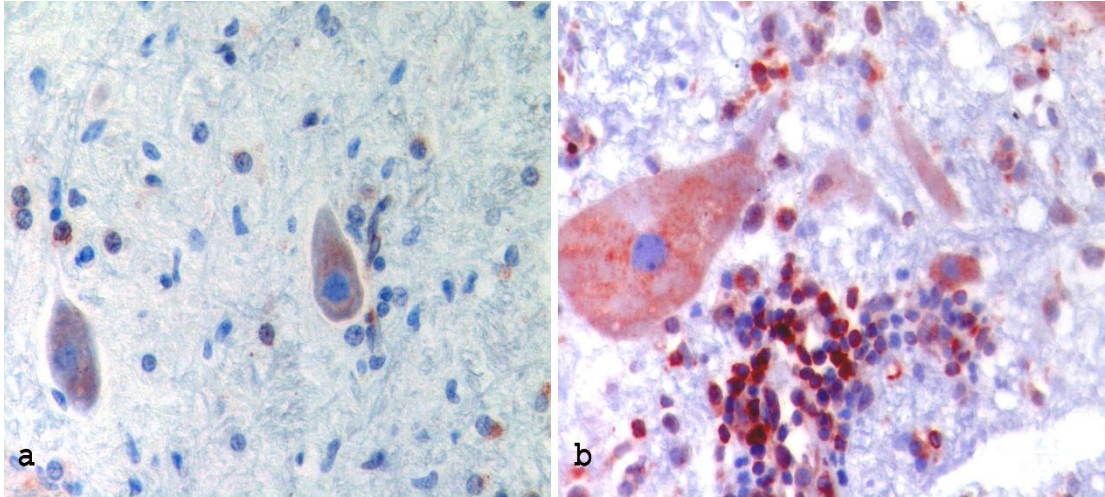


Şekil 4.14. Perivasküler hücrelerde HMGB1 immunreaktivitesi. a: kronik olguda yoğun perivasküler sitoplazmik ve nükleer immunopozitiflik, b: Subakut bir olguda birkaç immunopozitif perivasküler mononükleer hücre. rombenşefalon bölgesi, koyun, SABPK metod/AEC, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.

Nöron ve endoteldeki immunreaksiyon, kontrol gruplarındaki skorlama ile karşılaştırıldı ve nöronlarda HMGB1 ekspresyonunda bir artış gözlemlendi (Şekil 4.15). *Listeria* pozitif ve kontrol dokularda nöronlardaki HMGB1 immunreaktivitesinin sadece intrasitoplazmik olduğu görüldü (Şekil 4.16). Akut ve kronik vakalarda kontrollere göre oldukça yüksek yoğunlukta immunreaktivite dikkati çekti. Subakut vakalarda nöronlardaki ekspresyonunun kontroller ile benzer düzeyde olduğu gözlemlendi.



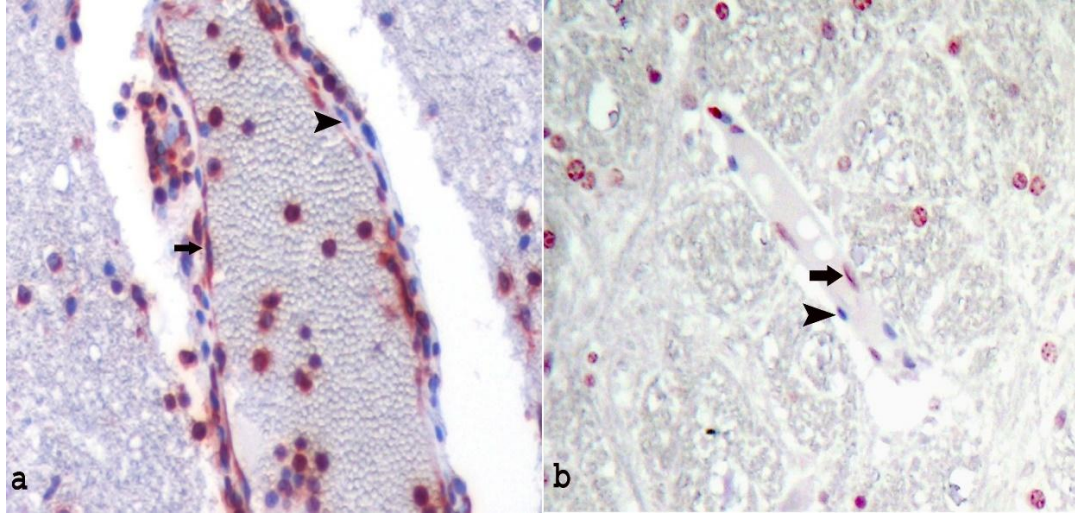
Şekil 4.15. Kontrol ve *Listeria* pozitif grupların HMGB1 immunopozitiflik skorlaması



Şekil 4.16. a: Kontrol beyin dokusunda nöronda HMGB1 için hafif immunoreaksiyon, b: Akut bir olguda HMGB1 için nöronal sitoplazmik ve glial hücrelerde yoğun sitoplazmik ve nüklear immunoreaksiyon. Rombensefalon bölgesi, koyun, SABPK metod/AEC, Mayer's hematoxilen karşıt boyama.

Endotel hücrelerinde, kontrol gruplarına göre daha yüksek oranda HMGB1 immunopozitifliği görüldü (Şekil 4.15). Endoteldeki pozitif reaksiyon çoğunlukla sitoplazmada, daha az oranda nükleustaydı (Şekil 4.17). Lezyon süresine göre endotel

hücrelerindeki HMGB1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi.



Şekil 4.17. Endotel hücrelerinde immunoreaktivite, a: Akut olguda HMGB1 için endotel hücrelerinde şiddetli sitoplazmik ve nüklear immunopozitiflik (ok) yanında bazı endotel hücrelerinde negatif immunreaksiyon (okbaşı), b: Listeria negatif kontrol dokuda bazı endotel hücrelerinde hafif nüklear immunopozitif (ok) ve immunonegatif reaksiyon (okbaşı), rombensefalon bölgesi, koyun, SABPK metod/AEC, Mayer's hematoksilen karşıt boyama.

4.2.3. İkili immunfloresan boyama sonuçları

Listerial ensefalitis tanısı konan 15 adet koyun ile 5 adet kontrol koyuna ait beyinlerin rombensefalon bölgesinde HMGB1 ekspresyonunun, oligodentrosit (Olig2), astrosit (GFAP) ve mikroglialardaki (CD11b) subsellüler yerleşimi ve yoğunluğunu belirlemek üzere yapılan ikili immunfloresan boyamaların semikalitatif değerlendirmesi Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Akut olgularda en çok oligodentrositlerde HMGB1 ekspresyonu görülürken, immunopozitifliğin yoğun olarak bu hücrelerin sitoplazmasında şekillendiği dikkati çaktı. Subakut ve kronik olgularda ise HMGB1'in en yoğun immunreaksiyonu mikroglialarda ve bu hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasında aynı oranda rastlandı. Bütün olgular toplam olarak değerlendirildiğinde HMGB1 immunreaktivitesi en yoğun hücreler sırasıyla mikroglialar, oligodentrositler ve astrositler olarak şekillendiği dikkati çaktı.

Tablo 4.2. İkili immunfloresan boyamalarda HMGB1 yoğunluğunun hücrel yerleşime göre skorlanması

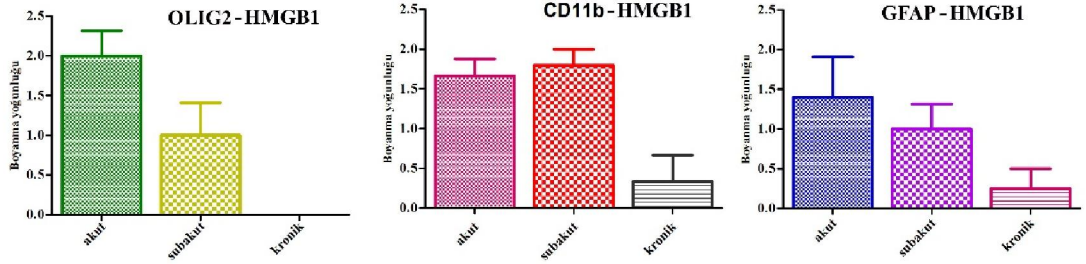
Olgu No	Oligodentrositde		Astrositlerde		Mikroglialarda	
	n	s	n	s	n	s
1	0	3	1	2	2	1
2	0	3	0	0	2	1
3	2	1	0	0	VY	VY
4	0	1	VY	VY	1	1
5	VY	VY	0	0	1	1
6	VY	VY	0	2	0	0
7	VY	VY	1	2	1	2
8	2	0	3	0	2	0
9	1	0	2	0	2	1
10	1	0	0	1	2	1
11	VY	VY	0	0	2	1
12	2	2	1	0	1	2
13	VY	VY	0	0	2	1
14	2	1	1	1	2	1
15	2	0	0	2	1	1
K-1	2	0	0	0	1	1
K-2	2	0	0	0	2	0
K-3	3	0	0	0	2	0
K-4	1	0	0	0	3	0
K-5	1	0	0	0	3	0

VY:veri yok (kesitte hiçbir immunreaksiyona rastlanmadı) 0= boyanma yok (hedef hücrede immunreaksiyon yok), 1= \leq %10, 2= %10-50, 3= \geq %50 K:Kontrol n=nükleer, s=sitoplazmik

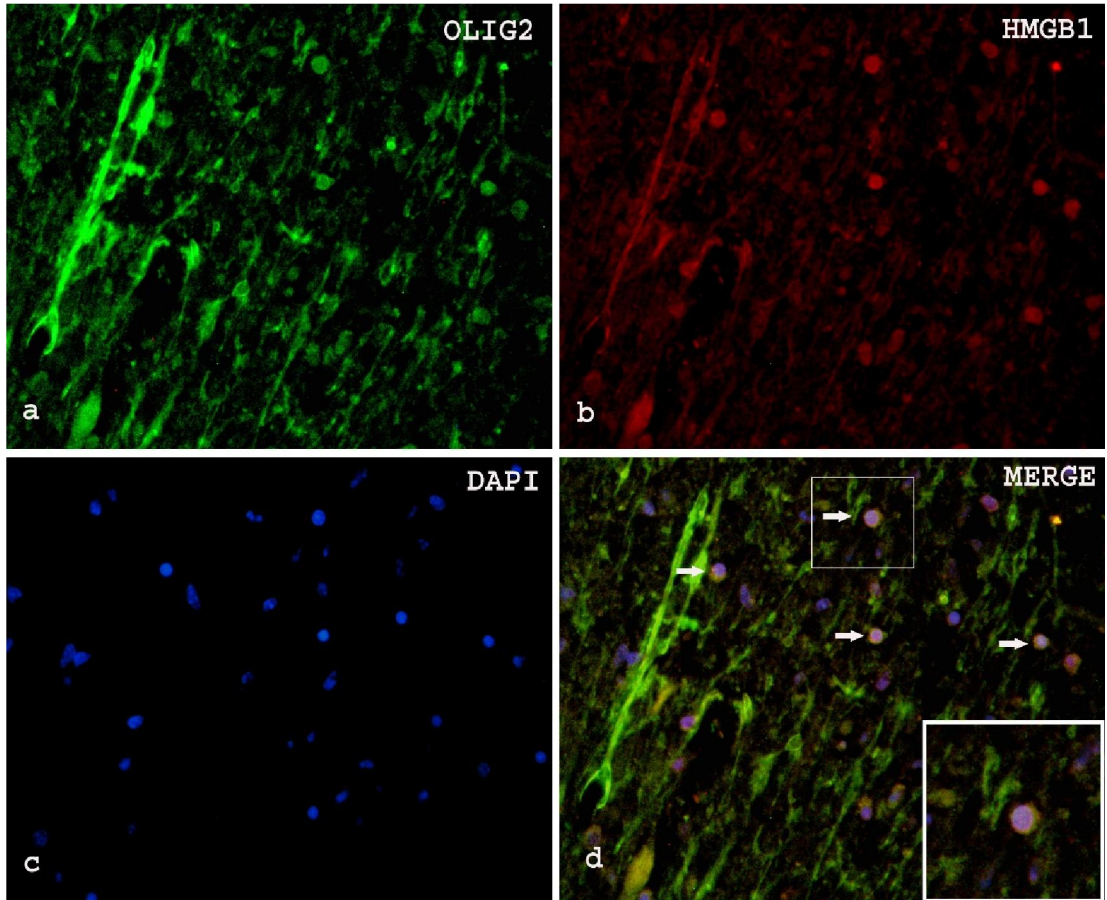
4.2.3.1. Oligodentrositlerde HMGB1 ekspresyonu (HMGB1 ve OLIG2 için ikili immunfloresan boyama)

Oligodentrositleri göstermek üzere Olig2 ile yapılan immun boyamalarda immunreaksiyonun seçici olarak bu hücrelerin çekirdeklerinde olduğu dikkati çekti. Bu hücrelerde HMGB1 ekspresyonunun subselüler lokalizasyonunda farklılıklar olmakla beraber, şiddetinin akuttan kroniğe doğru bir azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.18). Akut olgularda oligodentrositlerde HMGB1 ekspresyonu +3 ve +2 şiddetinde, çoğunlukla da sitoplazmik karakterde olduğu dikkati çekti. Subakut olgularda ise oligodentrositlerde HMGB1 boyanması, akut olgulara göre daha az yoğunlukta saptandı. Subakut olguların tamamında HMGB1 ekspresyonu oligodentrositlerin hem çekirdek, hem de sitoplazmasında rastlandı. Kronik olguların sadece birinde (olgu no 3) oligodentrositlerde HMGB1'in +2 immunopozitifliği görüldü. Bu olgudaki immunoreaksiyonun daha çok oligodentrositlerin

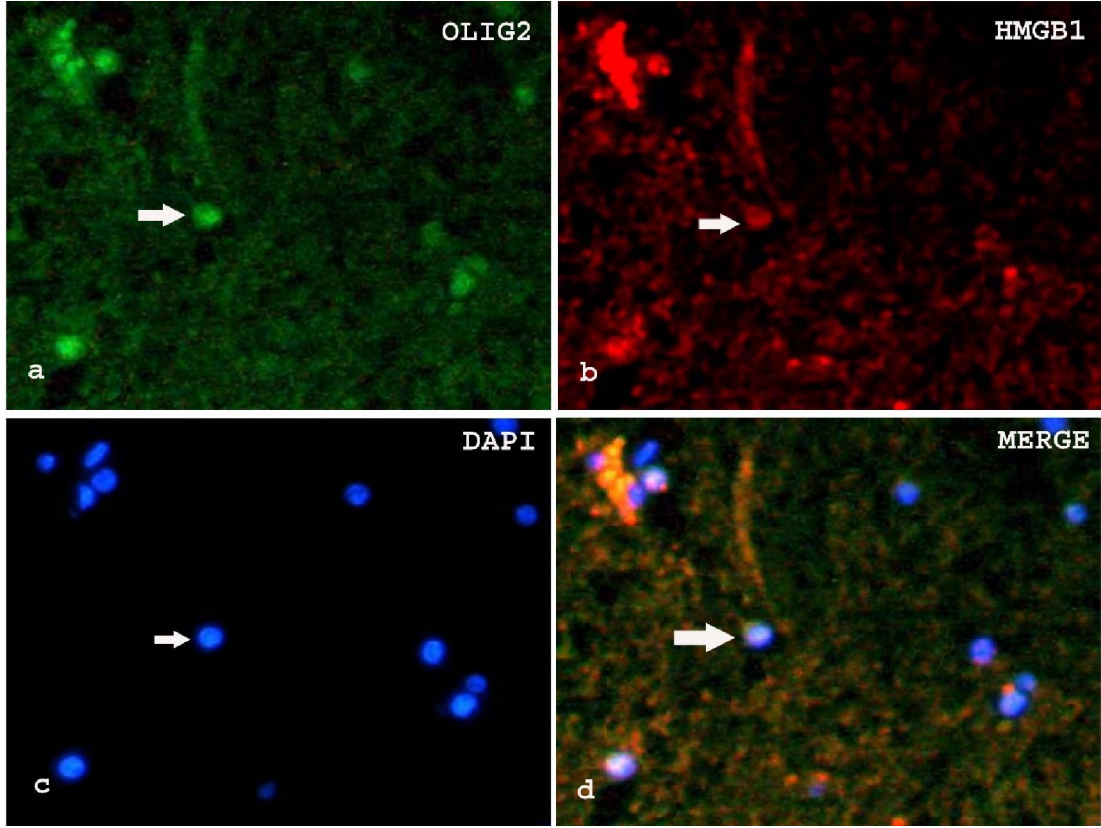
sitoplazmasında olduğu dikkati çaktı (Şekil 4.19). Kontrol dokuların Olig2 ve HMGB1 ile yapılan ikili immunfloresan boyamalarında orta şiddette nükleer immunreaktivite görüldü (Şekil 4.20).



Şekil 4.18. Hücre belirteçleriyle yapılan ikili immunfloresan boyama analizine göre HMGB1 ekspresyonu



Şekil 4.19. Oligodentositlerde HMGB1 ekspresyonu (ok), a: Olig2 ekspresyonu, FITC, b: HMGB1 ekspresyonu, Rodamin, c: DAPI çekirdek boyası, d: Birleştirilmiş (merged), Olig2+ hücrede HMGB1 immunreaktivitesi. Rombensefalon, koyun (olgu 12), ikili immunfloresan yöntem.

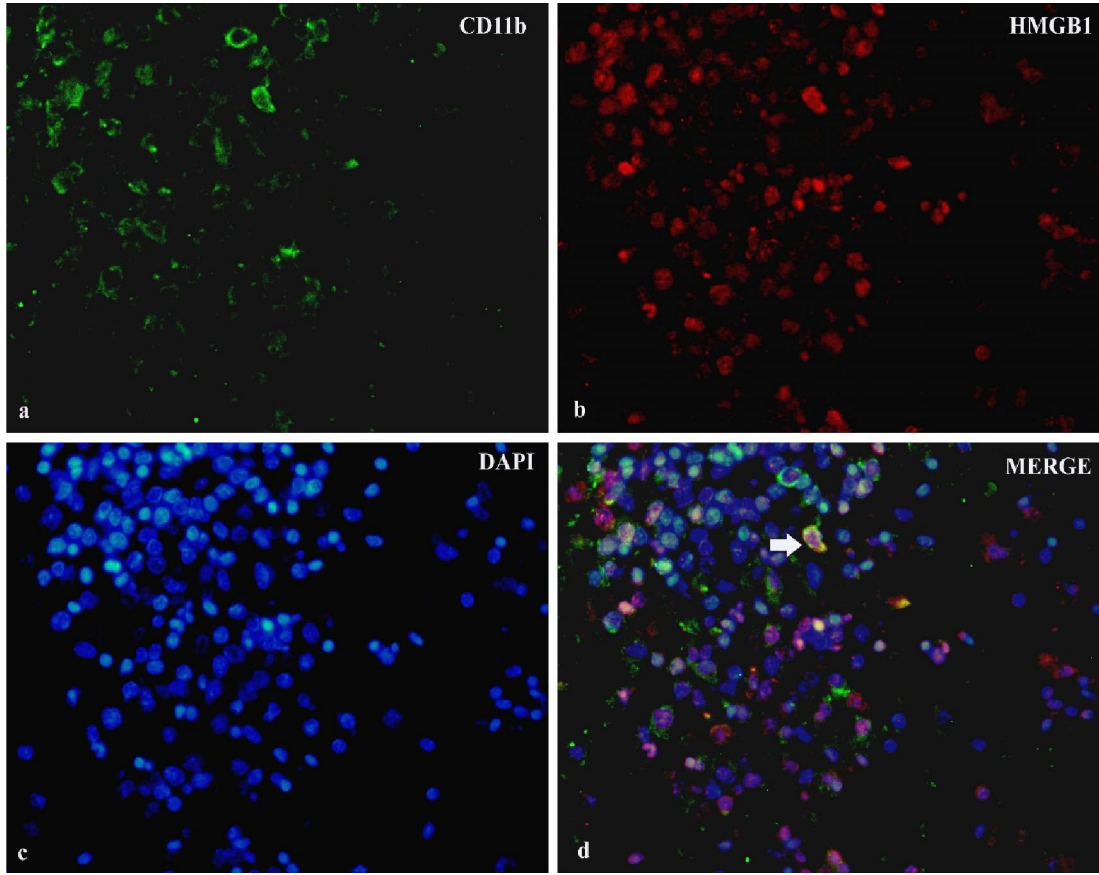


Şekil 4.20. Kontrol dokuda oligodentrositlerde HMGB1 ekspresyonu, a: Olig2 immunopozitif hücre (ok), FITC, b: Aynı alanda HMGB1 immunopozitif hücre (ok), Rodamin. c: a ve b ile aynı hücrede DAPI çekirdek boyası (ok), e: Birleştirilmiş (merged), Olig2+ hücrede HMGB1 immunreaktivitesi. Rombensefalon, koyun, ikili immunfloresan yöntem.

4.2.3.2. Mikroglialarda HMGB1 ekspresyonu (HMGB1 ve CD11b için ikili immunfloresan boyama)

Mikrogliaları belirlemede kullanılan CD11b ile HMGB1 için yapılan ikili immunfloresan boyama sonuçlarına göre, mikroglialardaki HMGB1 ekspresyonu subakut olgularda artarken, kronik olgularda en düşük seviyesine indi (Şekil 4.18). Akut olguların dördünde (Olgu no; 1, 2, 8 ve 10) aktif mikroglialarda +2 yoğunlukta HMGB1 boyanması görüldü (Şekil 4.21). Olgulardan ikisinde (Olgu no; 4-7) +1 olarak derecelendirilen HMGB1 boyanması görüldü. Altı akut olgudan beşinde (Olgu no; 1, 2, 4, 7 ve 10) mikroglialardaki HMGB1 boyanması çoğunlukla çekirdek ve sitoplazmada görülürken, 8 nolu olguda sadece çekirdekte boyanma vardı. Beş subakut olgunun dördünde (Olgu no; 9, 11, 12 ve 14) +2 yoğunlukta mikroglial HMGB1 görülürken, boyanmaların genelde çekirdek ve sitoplazmada birlikte olması dikkati çekti. 15 nolu subakut olguda mikroglialdaki yoğunluk +1 olarak derecelendirildi.

Kronik olguların sadece birinde (olgu no:13) mikroglia da hafif HMGB1 immunopozitiflik elde edildi (Tablo 4.2).

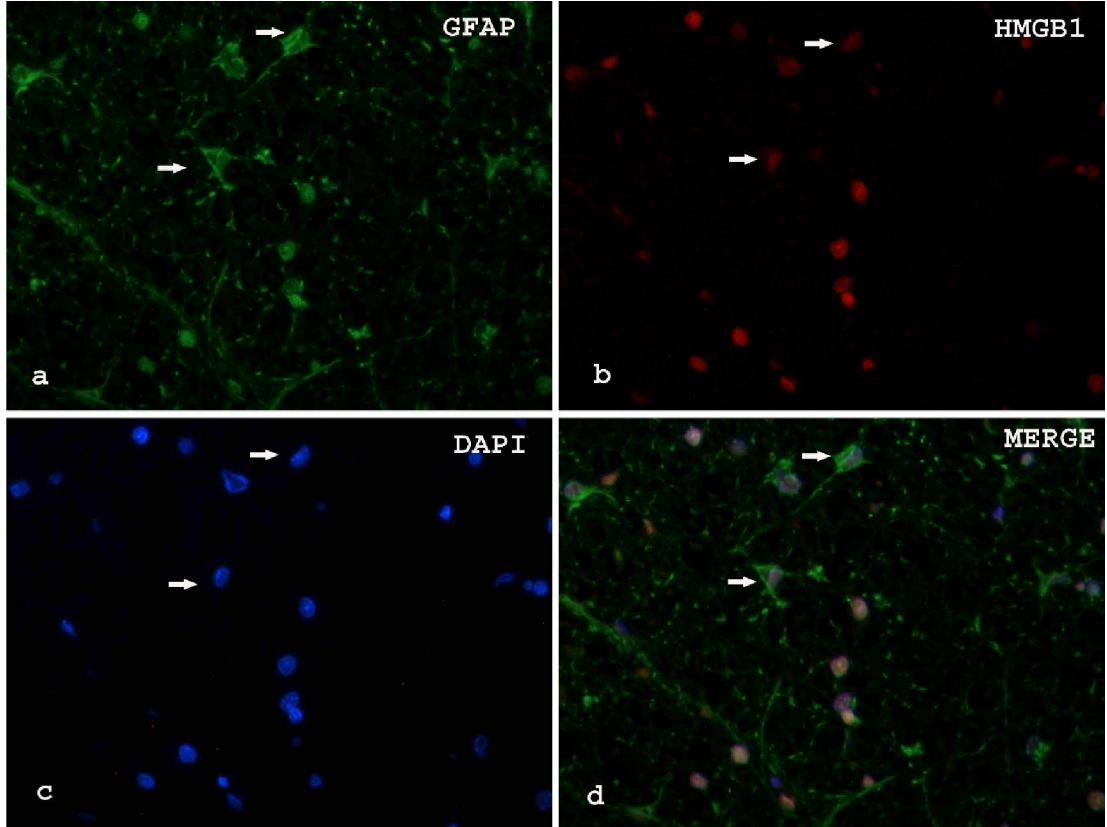


Şekil 4.21. Akut bir olguda, mikroglia hücrelerinde HMGB1 ekspresyonu (ok), a: CD11b ekspresyonu, FITC, b: HMGB1 ekspresyonu, Rodamin, c: DAPI çekirdek boyası, d: Birleştirilmiş (merged), CD11b pozitif hücrede HMGB1 immunreaktivitesi. Rombensefalon, koyun, ikili immunfloresan yöntem

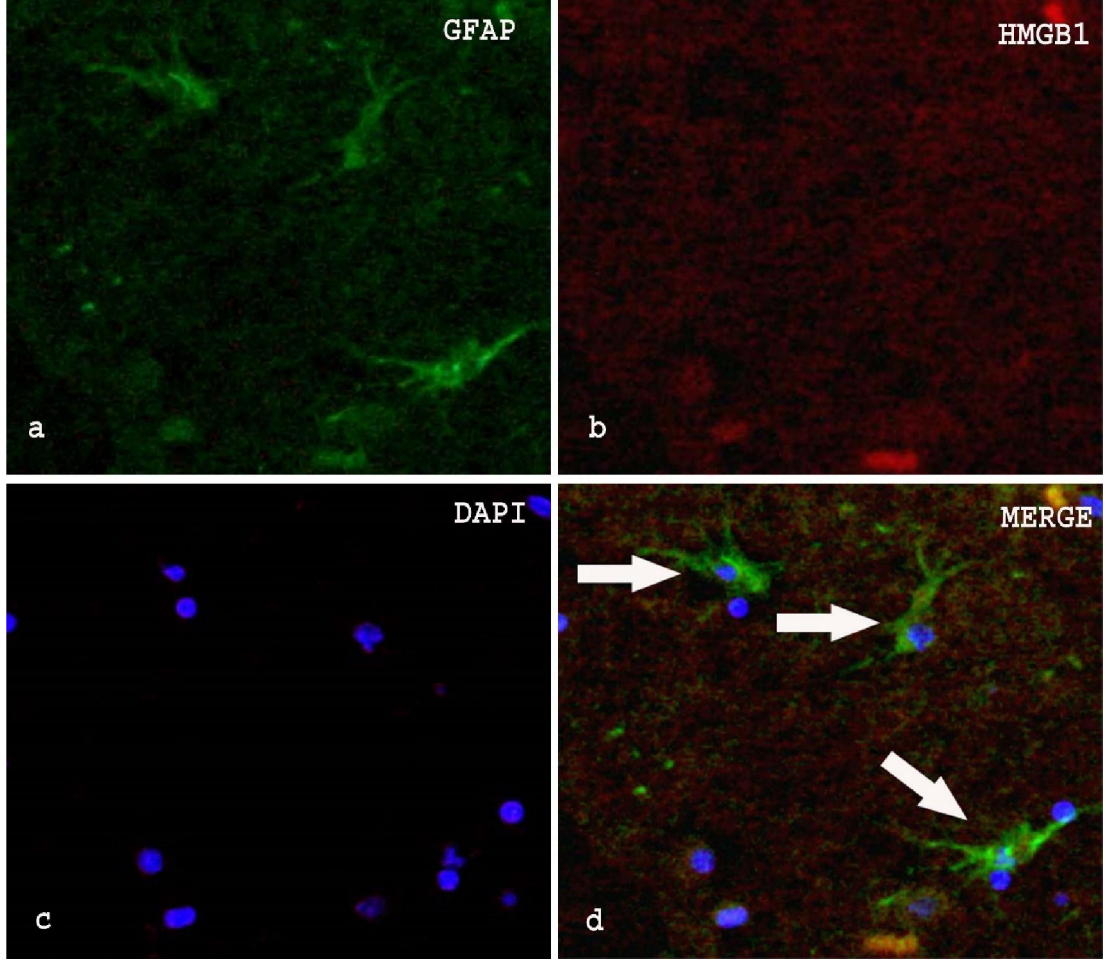
4.2.3.3. Astrositlerde HMGB1 ekspresyonu (HMGB1 ve GFAP için ikili immunflouresan boyama)

Altı adet akut olgudan birinde (Olgu no; 4) lezyonların içerisinde GFAP-pozitif astrosit'e rastlanmadı. Birinde (olgu no; 2) GFAP pozitif hücrelerin hiçbirinde HMGB1 için immün reaksiyon gözlenmedi. Kalan dört akut olgudan 1 ve 8 nolu olgularda GFAP-pozitif astrositlerde +2 şiddetinde, diğer iki olguda ise +1 şiddetinde HMGB1 pozitifliği saptandı (Şekil 4.22). Akut olgularda astrositlerdeki HMGB1 ekspresyonunun hem sitoplazmik hem de nuklear olduğu dikkati çekti. Subakut olgulardan birinde (olgu no; 9) +2 yoğunlukta HMGB1 boyanması görülürken, geri kalan dört olguda astrositlerdeki HMGB1 boyanması +1 olarak derecelendirildi. Subakut iki olguda (olgu no; 9 ve 12) HMGB1 boyanması astrositlerin sadece

çekirdeklerinde görülürken (Şekil 4.22), diğer iki subakut olguda bazı astrositlerde çekirdekte, bazı astrositlerde sitoplazmada boyanma görüldü. Dört adet kronik olgunun sadece birinde (olgu no; 6) astrositlerde HMGB1 görülürken, yoğunluk +1 olarak derecelendirildi. Bu olguda boyanmanın çoğunlukla sitoplazma ve çekirdekte olduğu görüldü (Tablo4.2). Kontrol dokuların hiçbirinde GFAP pozitif hücrelerde HMGB1 immunoreaktivitesine rastlanmadı (Şekil 4.23).



Şekil 4.22. Astrositlerde HMGB1 ekspresyonu (ok), a: Aynı hücrelerde GFAP pozitif astrositler, FITC. b: HMGB1 için çoğunlukla nuklear boyanma, rodamin c: DAPI çekirdek boyaması, d: Birleştirilmiş fotoğraf (merged), astrositlerde nuklear HMGB1 immunreaktivitesi (ok), Rombensefalon, koyun, ikili immunfloresan yöntem.



Şekil 4.23. a: Kontrol dokuda, GFAP pozitif astrositler, FITC, b: Aynı alanda HMGB1 negatif immunreaksiyon, Rodamin c: çekirdek boyaması, DAPI, d: Birleştirilmiş fotoğraf (merged), Astrositlerde negatif HMGB1 immunreaksiyon (ok), Rombensefalon, koyun, ikili immunfloresan yöntem.

5. TARTIŞMA

Listeriosis evcil hayvanlar arasında ruminantlarda önemlidir ve listerial ensefalitis hemen hemen sadece erişkin ruminantlarda gözlenir. Bununla birlikte patogenezi tam anlaşılamamıştır. Listerial ensefalitisin patogenezinde, etken ağız boşluğundaki sinir uçlarına girer ve kranial sinirlerde retrograd aksonal taşıma yoluyla MSS'ne ulaşır. Trigeminal ve diğer kranial sinirler beyin sapında sonlanır. Böylelikle *L. monocytogenes* beyin sapında (pons, medulla oblongata) lokalize olur. Sinir uçlarına giriş mekanizması tam olarak bilinmeyen etkenin, in vitro sistemlerde, endositoz ve endositik veziküller yoluyla tipik olarak fagositik olmayan hücelere girdiği deneysel olarak gösterilmiştir. Listeria antijeni beyne ilk girdiğinde nöronlarda çoğalarak hücreden hücreye yayılır. Deneysel olarak *L. monocytogenes*'in nötrofiller, makrofajlar, fibroblastlar, endotelial hücreler, nöronlar ve mikroglial hücreler dahil çeşitli sinir hücrelerini enfekte ettiği gösterilmiştir. Doku hasarının mekanizması ise tam olarak aydınlatılamamıştır. Nöronların ve aksonların hasarı, muhtelemelen, listerializin ve lipazların etkisi ile farklı yangısal süreçler sonunda şekillendiği düşünülmektedir (Cantile ve Youssef, 2016).

Listerial ensefalitiste hastalık için patognomik olan histopatolojik bulgular çoğunlukla beynin rombensefalon bölgesinde tanımlanmıştır (Di Palma vd., 2012; Disson ve Lecuit, 2012; Dreyer vd., 2016; Haligur vd., 2019; Oevermann vd., 2010b). Çalışma için arşivden seçilen beyinlerin tamamında patognomonik histopatolojik bulgular yine bu bölgede görülmüştür. Tanımlanan mikroapseler ve perivasküler hücre infiltrasyonları şeklindeki bulgular sunulan çalışmadaki tüm olgularda da gözlenmiştir.

Listeriosisde şekillenen lezyonlar, lezyonun süresine, mikroapsenin büyüklüğüne, perivasküler hücre infiltrasyonunun yapısına göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre, beyinde çoğunlukla, nötrofil lökositlerin baskın hücreler olduğu (tip 1 mikroapse) olgular akut ensefalitis olarak, buna karşın çoğunlukla makrofajların baskın olduğu lezyonları içeren (tip 2 mikroapse) olgular kronik ensefalitis olarak evrelendirilmiştir. Mikroapselerde nötrofil ve makrofajların birlikte olduğu lezyonların çoğunlukta olduğu olgular ise subakut ensefalitis kategorisinde değerlendirilmiştir (Oevermann vd., 2010a). Bu gruplandırmaya göre sunulan çalışmada arşivden rastgele seçilen listerial ensefalitis olgularından 6 adet olgu akut, 5'i subakut, 4 adedi ise kronik ensefalitis olarak değerlendirilmiştir.

Mikroapse oluşumları yanında ağırlıklı olarak lenfositler, makrofajlar ve daha az sayıda plazma hücresi ve nötrofillerden oluşan perivasküler hücre infiltrasyonları çoğunlukla mikroapselerin yoğun olduğu alanlara komşu bölgelerde gözlenmiştir. Perivasküler hücre infiltrasyonları sadece kronik ve subakut ensefalitisi olan hayvanlarda değil, aynı zamanda akut ensefalitis olarak değerlendirilen olgularda da saptanmıştır. Bununla birlikte, bu tarzdaki perivasküler manşetleri oluşturan hücre kalınlığı, akut olgulara nazaran daha fazla olarak sırasıyla kronik ensefalitis ve subakut ensefalitis olgularında görülmüştür. Yapılan çalışmadaki bu tarz bulgular daha önce yapılan Oevermann vd. (2010a) ve Headley vd. (2014)'in çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur. Perivasküler infiltrasyonlara rağmen, in vitro çalışmalarda bakterinin insan beyin mikrovasküler hücreleri ile umbilikal ven endotel hücrelerini internalin B aracılığı ile enfekte edebildiği bildirilmiştir ve bu hücrelerde bakteri aktin kuyruk oluşumuyla ve hücreden hücreye yayılmak suretiyle yaşayabildiği, çoğaldığı ve hareket ettiği saptanmıştır (Parida, vd., 1998). Bununla birlikte in vivo olarak, bakteri beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde lokal bir enfeksiyona neden olmak yerine hücreden hücreye hızlıca geçiş yapması nedeniyle, listerial ensefalitiste yaygın bir vaskülitis görülmediği bildirilmiştir (Disson ve Lecuit, 2012). Buna karşın nadir olgularda vaskülitisin şekillendiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (Miller ve Zachary, 2017; Oevermann vd., 2010a). Sunulan bu çalışmada rombensefalon bölgesinde perivasküler hücre infiltrasyonları gözlenmekle beraber, hiçbir olguda vaskülitise ait lezyonlara rastlanmamıştır.

Çalışmada, listeria antijeninin MSS'ndeki dağılımını incelemek amacıyla immunohistokimyasal metot uygulanmış ve 15 adet olgudan 6 tanesinde antijen immunopozitif reaksiyon elde edilmiştir. Çalışma materyallerini arşiv parafin bloklar oluşturmuş olup, parafin bloğun yaşı, fikzasyon süreleri gibi immunohistokimyasal boyamalarda reaksiyonu doğrudan etkileyen faktörlerin farklılık gösterdiği kaydedilmiştir. Seçilen parafin bloklardan hazırlanan kesitlerde, immunreaksiyonların her olguda görülmemesi, parafin bloğun yaşına ve muhtemel uzamış fikzasyon sürelerine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Listeria antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda araştırmacılar medulla oblongata, pons, beyin kökü ve thalamusda en yoğun immunoreaksiyonları görmüşlerdir. Daha az yoğunlukta serebrum ve serebellumda da antijenin varlığı immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Campero vd., 2002; Haligür vd., 2019; İlhan vd., 2012; Loeb, 2004;

Karayığit ve Dinçel, 2020). Poliklonal listeria antikoru ile yapılan immunohistokimyasal teknikte etken; glial/meningeal hücrelerde, nöronlarda, perivasküler mononükleer hücrelerde, nekrotik alanlar ve mikroapse alanlarındaki nötrofil ve makrofajların sitoplazmalarında veya bu alanlarda ekstraselüler yerleşimli, çubuk, sirküler veya oval (Campero vd., 2002; Loeb, 2004), pleomorfik, yuvarlak (İlhan vd., 2012), diffuz veya granüler (Karayığit ve Dinçel, 2020) şekilde saptanmıştır. Literatürle uyumlu olarak, sunulan çalışma olgularında rombensefalon bölgesinde, listeria antijeni için en yoğun immunohistokimyasal reaksiyon, baskın olarak mikroapselerde olmak üzere, nekrotik alanlar, meningeal alan, perivasküler manşetlerde, nöron ve makrofajlarda sitoplazmik veya ekstraselüler yerleşimli çubuk ya da yuvarlak şekilde görülmüştür. Ancak Campero vd. (2002)'nin çalışmalarında belirttikleri gibi, nötrofil içermeyen yangı alanlarında ve yakınlarındaki perivasküler manşette az sayıda fagositin etkeni içerdiği görülmüştür.

Kontamine gıdalarla alınan *Listeria*'nın, dış eti yaralanmaları gibi patolojik veya fizyolojik yaralar yoluyla oral mukozal bariyeri aşması muhtemeldir. Oral mukozayı istila ettikten sonra, bakteriler trigeminal sinirler ile aksonlar yoluyla beyne ulaşır. Deneysel enfeksiyonlarda *Listeria*'nın kan-beyin bariyerini aşabileceği de ifade edilmektedir. Buna karşın, doğal olarak şekillenen listerial ensefalitiste etkenin spesifik dağılımı, hematogen bir enfeksiyon ile tutarsızdır. Gebe ruminantlara intravenöz veya oral olarak verilen etken intrauterin enfeksiyona neden olmakla beraber nadiren intrakraniyal enfeksiyon oluşturabilir. Ancak bu intrakraniyal enfeksiyon hiçbir zaman listerial ensefalitisteki gibi spesifik dağılımda şekillenmez. Gebe bir hayvan ensefalitik listeriosisten öldüğünde, uterus içeriği genellikle sterildir (Cantile ve Youssef, 2016). Çalışmada incelenen olguların tamamında patognomonik histopatolojik bulguların yoğun olarak beynin rombensefalon bölgesinde görülmesi ve listeria antijeni ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda endotel hücrelerinde immunreaksiyon görülmemesi, bakterinin beyni hematogen yolla enfekte edebileceği fikrini desteklememektedir. Yapılan bu çalışmada, HMGB1 proteini, kontrol beyin dokularında endotel hücrelerinin nükleuslarında hafif düzeyde ifade edilmişken, listerial ensefalitisli olgularda MSS endotel hücrelerinin özellikle sitoplazmalarında yüksek ifadesi görülmüştür. Burada sunulan veriler beyin mikrovasküler endotelinden HMGB1 ifadesinin, listerial ensefalitis sırasında MSS'ne lökosit alımını kolaylaştırmada önemli bir rol oynayabileceği fikrini düşündürmüştür.

HMGB1 proteininin çeşitli çalışmalarla otoimmün hastalıklarda, kanserde, travma ve yangısal enfeksiyonlarda önemli bir biyobelirteç olabileceği ortaya konmuştur (Paudel vd., 2018; Venereau vd., 2016; Wang vd., 2019). Son yıllarda çeşitli yangısal hastalıklarla bağlantılı proinflamatuvar bir sitokin olarak ve anti-inflamatuvar terapinin bir hedefi olarak düşünülmüştür (Andersson vd., 2018). Bununla birlikte bu proteinle ilgili çalışmaların artmasıyla elde edilen veriler doğrultusunda, HMGB1 birçok hastalıkta kullanılacak ilaçlar için hedef protein olarak tanımlanmış ve bu DAMP'ın klinikteki önemini göstererek, mevcut ilaçları iyileştirmek için yeni bir perspektif açmıştır (Vénéreau ve ark., 2016). Yapılan bu çalışma ile veteriner hekimlikte sınırlı sayıda araştırmaya (Duan vd., 2014; Furukawa vd., 2011) konu olan HMGB1 proteininin, koyunların listerial ensefalitisinde lezyonların oluşum sürecinde ekspresyonu araştırılmıştır.

HMGB1 hem nükleer bir faktör, hem de salgılanan bir proteindir. Biri nekrotik ve hasarlı hücrelerden pasif salınımı, diğeri ise immuno-kompetent hücrelerden aktif salınmayı içeren iki mekanizma yoluyla hücrelerden salınır. HMGB1'in, son zamanlarda çeşitli yangısal hastalıklarla ilişkili bir proinflamatuvar sitokin olarak görev yaptığı gösterilmiştir. Nekrotik hücre ölümüne uğrayan hücreler tarafından pasif olarak serbest bırakıldığında bir DAMP olarak işlev görmektedir (Scaffidi vd., 2002).

Çoğu hücrede HMGB1 çekirdekte lokalizedir. Kromatinde, nükleoprotein komplekslerinin bölgeye özgü DNA bağlayıcı proteinler tarafından birleştirilmesini kolaylaştıran bir faktör olarak görev yapar (Hock ve ark., 2007). Bu çalışmada normal koyun beyinde, oligodentrositlerin ve mikrogliaların çekirdeklerinde HMGB1 gözlenmiştir. Bununla birlikte listerial ensefalitisli beyinde oligodentrosit, astrosit ve mikroglia da sitoplazma ve çekirdekte birlikte görülmüştür. Son zamanlarda HMGB1'deki yüksek oranda korunmuş üç sistemin kolayca oksitlendiği ve bunun HMGB1 yapısında değişikliklere sebep olmasıyla sitoplazmada birikmesine neden olduğu bildirilmiştir (Hoppe ve ark., 2006). Bu aktif HMGB1 salgılanması iki aşamada gerçekleşir. HMGB1 A ve B kutu alanlarında bulunan liziner asitlerin JAK/STAT1 ile regüle edilen hiperasetilasyonundan sonra çekirdekten sitoplazmaya translokasyona uğrar (Lu ve ark., 2014). Endoplazmik retikulum için bir sinyal peptidinden yoksun olduğundan, bu birikmiş HMGB1 lizozomlar tarafından hücre dışına salınabilir. Dahası hücre dışı HMGB1 bir proinflamatuvar sitokin olarak işlev görebilir ve yangıyla ilgili hücreleri aktive ederek diğer sitokinlerin salınmasına ve beyin hasarının

şiddetlenmesine neden olabilir (Kim ve ark., 2006; Kim ve ark., 2008). Hastalığın süresi ilerledikçe HMGB1'in ekspresyonunun azalması, hücrede tükenmesinden ya da ekstraselüler boşluktan dolaşım ile uzaklaştırılmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Akut olgularda hücrelerin çekirdeklerinde görülen yoğun HMGB1 immunreaktivitesinin, subakut ve kronik olgularda azalması listerial ensefalitisli beyinde HMGB1'in hücre dışı ortama büyük ölçüde salındığını düşündürmektedir.

HMGB1'in enfeksiyonlar sırasında aktif olarak hangi hücreler tarafından salındığını gösteren az sayıda çalışma vardır. MSS'nde listerial ensefalitis ve HMGB1 protein ilişkisini ele alan in vivo veya in vitro herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, in vitro olarak yapılan bir çalışmada mikobakteriyel enfeksiyonda makrofajlar ve monositik hücrelerde aktif bir şekilde salındığı gösterilmekle birlikte, doku veya hücre hasarının bir sinyali olarak hareket edebileceği ve bağışıklık tepkisini arttırabileceği sonucuna varılmıştır (Grover vd., 2008). Dzaman vd. (2015) HMGB1 ve RAGE'nin kronik rinosinüzitis vakalarındaki ekspresyonu ve işlevini araştırdıkları çalışmalarında, kontrol grubu ile hasta grup arasında immunpozitiflikte bir fark görememişlerdir. Hernandez-Pando vd. (2015) deneysel tüberkülozda HMGB1'in kinetiğini, hücre kaynaklarını ve işlevini belirlemek için yaptıkları çalışmalarında enfeksiyonun geç safhalarında enfeksiyonun ilk gününden sonra hızlı ve yüksek bir HMGB1 salgısı görmüşlerdir. Ardından üçüncü günde keskin bir düşüş ve yedinci günde tekrar arttığını ancak birinci günden üç kat daha az ve hafif konsantrasyonda olup, hastalığın geç dönemlerine kadar sürekli olarak sürdürüldüğünü kaydetmişlerdir. Bu deneysel çalışmada, HMGB1'in özellikle erken enfeksiyon sırasında hava yolu epitelinden hızla serbest kaldığını göstermişlerdir. Dzaman vd. (2015) ve Hernandez-Pando vd. (2015) 'nın sonuçlarıyla uyumlu olarak yapmış olduğumuz bu çalışmada astrosit ve oligodentrositlerde HMGB1 ekspresyonunda akut kroniğe doğru bir azalma görülse de mikroglia da dalgalı bir seyir görülmüş ve hücrelerin ifade ettikleri HMGB1 düzeyleri ile zaman bağımlı bir ilişki kurulamamıştır. Yine in vivo bir çalışmada nekrotik olmayan koşullar altında, insan dendritik hücre ve T hücre kültüründe, Dengue virus enfeksiyonunun kültürdeki her iki hücrede de HMGB1 ekspresyonunu arttırdığını ve kontrollerde sadece çekirdekte olan HMGB1 ekspresyonunun, enfekte hücrelerde hem nükleus hem de sitoplazmik olarak arttığı bildirilmiştir (Kamau vd., 2009). Newcastle hastalık virusu ile yapılan bir çalışmada (Qu vd., 2018), HMGB1'in tavukların çoğu dokusunda yaygın olarak ifade edildiğini

ve bu proteinin Newcastle hastalığı virüsü ile enfeksiyonda önemli bir yangısal faktör olduğu saptanmış olup, enfekte DF-1 ve A549 hücrelerinde sekresyonunun arttığı ve HMGB1'in enfekte hücrelerde nukleustan sitoplazmaya yer değiştirdiği bildirilmiştir. Diğer bir viral çalışmada, insanların hepatitis C virusu ile enfekte hepatoma hücreleri (Huh5.5.1) ve böbrek karsinom hücreleri (HEK293FT)'inde HMGB1 ekspresyonunun enfekte hücrelerde nukleustan sitoplazmaya ve daha sonra ekstrasellüler boşluğa yer değiştirerek, virus çoğalmasını sınırladığı ve enfeksiyonu bloke ettiği saptanmıştır (Jung vd., 2011). İnsan sağlığını etkileyen bir hastalık olarak, Covid-19 ile ilişkili şiddetli pulmoner enfeksiyonda ekstrasellüler HMGB1'in tedavi amaçlı bir hedef olabileceği öngörülmüştür (Andersson vd., 2020). Bu çalışmaya göre, sitokin fırtınası sırasında aşırı hücre dışı HMGB1 düzeylerinin doku hasarı ve organ disfonksiyonuna neden olduğu ve bu hastalıkta HMGB1'in tedavi amaçlı bir hedef olabileceği ifade edilmektedir. HMGB1'in fungal hastalıklardaki rolünü araştıran bir çalışmada (Wang vd., 2020), insan ve fare modeli *Candida albicans* enfeksiyonunda HMGB1 ekspresyonunu arttığı saptanmış ve enfeksiyonda HMGB1 inhibitörü etil pruvat kullanımının HMGB1 ekspresyonunu ve salınımını bloke ederek, bu enfeksiyondan kaynaklanan ölüm oranlarını azalttığı saptanmıştır. Sonuçta HMGB1'in invaziv *C. albicans* enfeksiyonunda etkili diagnostik ve teröpatik bir hedef olabileceği bildirilmiştir.

Çalışmamızda, HMGB1'in ekspresyonunu değerlendirmek için yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, listerik ensefalitisli olgularda nöron sitoplazmalarında HMGB1 ekspresyonunun kontrol beyin dokularına göre daha fazla olduğu görülmüştür. Gao vd.,(2020)'nin ratlarda, nöron kaynaklı HMGB1'in kokaine bağlı davranışlar üzerindeki rolünü araştırdıkları çalışmalarında, kokain verilen ratlarda çalışmamızla benzer şekilde sitoplazmada immunreaktivite görmüşlerdir. Bununla birlikte hücre dışı HMGB1'in kısmen nöronlardan kaynaklandığını bildirmişler ve kokainin nöronal sitoplazmada ve hücre dışı yerde HMGB1'in artışını indüklediği sonucuna varmışlardır. Yapılan çalışmada, listerial ensefalitisli olgularda nöronlardaki yüksek HMGB1 ekspresyonu, listerialinin nöronlarda HMGB1'in ekspresyonunu indüklediğini düşündürmüştür. İntrasitoplazmik HMGB1 immunreaktivitesinin akut vakalarda yüksek olması daha önce yapılan çalışmalarda (Gao vd., 2020; Kim vd., 2008) HMGB1'in nöronlardan aktif olarak nükleusundan sitoplazmaya geçişiyle açıklanmıştır. Kronik olgularda nöron sitoplazmasındaki

yüksek immunoreaksiyon ise nekrotik hücrelerden pasif salınım olasılığını düşündürmüştür.

Kim vd. (2008) postiskemik rat beyinde HMGB1'in subselüler lokalizasyonunu inceledikleri çalışmalarında, endotel hücrelerde indüklendiğini göstermişlerdir. Mullins vd. (2004) HMGB1'in insan umbilikal ven endotel hücreleri tarafından salındığını bildirmişlerdir. Nishibori vd., (2020) HMGB1 ile kan-beyin bariyerinin bozulması ve beyin yangısı arasında bir ilişki olduğunu bildirmişler, beyin yangısı sırasında anti-HMGB1 antikollarının kullanılmasının kan beyin bariyerinin bozulmasını engellediği sonucuna varmışlardır. Sunulan çalışmada HMGB1'in, listeria pozitif vakalarda, MSS endotel hücrelerinin nükleus ve sitoplazmalarında kontrol gruplarına göre oldukça yüksek oranda ekspresyonu görülmüştür. Bu durum koyunlarda listerial ensefalitisin patogenezisinde ve muhtemelen kan beyin bariyerinin bozulmasında endotel hücreleri HMGB1'in önemli olabileceğini düşündürmüştür.

Yumuşak dokuda yangının geliştiği şiddetli bakteriyel enfeksiyonlarda ilgili bölgede HMGB1 bol miktarda bulunur ve HMGB1 seviyesi ile enfeksiyonun sonucunun ciddiyeti arasında bir ilişkili olduğu bildirilmektedir (Johansson vd., 2014). İmmunohistokimyasal inceleme sonuçlarına göre hedef proteinin en yoğun olarak mikroapse alanlarında ve buradaki makrofajlarda görülmesi, şiddetli olgularda bölgedeki salınımının arttığını göstermektedir. İncelenen hücrelerden en az HMGB1 salınımı mikroapse alanları ve perivasküler manşetlerdeki nötrofillerde olmuştur. Akut mikroapse alanlarında baskın olarak görülen nötrofillerde hafif düzeyde nükleer HMGB1 ekspresyonu saptanmıştır. Huang vd. (2017) yaptıkları çalışmada steril yangı sırasında nötrofillerdeki HMGB1'in, nötrofil hücre dışı tuzaklarının (NETs) oluşumundaki baskın rolünü göstermişlerdir. Steril yangıda ve bakteriyel enfeksiyonlarda nötrofillerden salınım oranının farklılık gösterebileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte, steril yangı ve enfeksiyöz ajana bağlı yangıda farklı sinyal yollarının yangıyı başlatabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan yangının geç mediatörü olarak bilinen HMGB1'in, yangı alanına ilk gelen hücreler olan nötrofillerden sınırlı salınımı ise şaşırtıcı olmaz. Johansson vd. (2014) çalışmalarında *Streptococcus pyogenes* 'ten kaynaklı şiddetli yumuşak doku enfeksiyonunda yaptıkları ikili immunofloresan yöntemde nötrofil ve HMGB1'in ortak lokalize olmadığını göstermişlerdir. Akut yangı alanındaki bazı nötrofillerin nükleuslarında hafif düzeyde

ifade ettiklerini gördüğümüz HMGB1'in, steril yangıda olduğu gibi NETs oluşumunda rolü olabileceği düşünülmüştür.

Kemotaktik ajanlar muhtemelen yangı odakları içindeki üretim alanlarından yayılan kemokinler tarafından oluşturulur. Astrositler ve resident mikroglia dahil olmak üzere aktive edilmiş glial hücreler, yabancı antijenleri tanıyan T lenfositler tarafından üretilen sitokinelere yanıt olarak yangı alanlarında kemokin ağları oluşturur. Antijen tipine ve patojenitesine bağlı olarak, yangısal yanıt çözülür (iyileşir) veya kronik bir faza ilerler (Miller ve Zachary, 2017). Proinflamatuvar bir sitokin olan HMGB1'in, MSS'nin yangısal yanıtında rol alan hücrelerdeki ekspresyonunun gösterildiği az sayıda çalışma mevcuttur. Frank vd. (2015) glikokortikoidlerin mikroglialdan HMGB1 sentezini ve salınımını indükleyerek bir alarm olarak işlev görebileceğini bildirmişlerdir. Kim vd. (2008) post-iskemik rat beynini inceledikleri çalışmalarında, mikroglia, oligodentrosit ve astrositlerde HMGB1'in indüklendiğini ikili immunohistokimyasal metot ile göstermişlerdir.

Listerial ensefalitiste HMGB1'in hücre bazda ekspresyonunu değerlendirmek üzere morfolojik olarak ayrımları güç olan glial hücreler için ikili immunfloresan yöntem kullanılmıştır. Hedef proteinin hangi hücre tipinde ve lokalizasyonda olduğunu değerlendirdiğimiz bu çalışmada, HMGB1'in lezyonların zamanına bağlı olarak, DAMP'ların MSS'deki ana hedefi olan üç glial hücre olan oligodentrositler, astrositler ve mikroglia hücreleri bazında incelendi. Bütün olgular temelinde HMGB1 immunreaktivitesi en yoğun olarak sırasıyla mikroglialar, oligodentrositler ve astrositlerde elde edildi. Lezyonun zamanına göre HMGB1 ekspresyonu incelendiğinde, akut olgularda en yoğun oligodentrositlerde, subakut ve kronik olgularda ise en yoğun mikroglialarda ifade edildiği görüldü. Choi ve Kim (2017) yaptıkları çalışmada HMGB1'in iskemiye bağlı beyaz maddedeki hasar ile ölmekte olan oligodentrositlerden salındığını göstermişlerdir. Bununla birlikte Kim vd. (2008) post-iskemik rat beynini inceledikleri çalışmalarında, reperfüzyondan hemen sonra HMGB1 immunreaktivitesini oligodentrosit benzeri hücrelerin sitoplazmalarında ve bazı hücrelerin çekirdekleri yanında, baskın olarak nöronlarda ve mikroglialda saptamışlar, reperfüzyon sonrası HMGB1 ekspresyonunun ilk dört saatte maksimum seviyeye ulaştığı, sonrasında düşüş eğilimine girdiğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada enfeksiyonun başlangıcı ile hayvanın ölümü arasında geçen süre bilinmemekle beraber, listerial ensefalitisin akut lezyonları ile subakut ve kronik

lezyonları arasında HMGB1 ekspresyonu karşılaştırıldığında, akut lezyonlarda en yoğun olarak oligodentrositlerde, subakut ve kronik lezyonlarda ise en yoğun şekilde mikroglialarda ifade edildiği gözlenmiştir. Yapılan son çalışmalar oligodentrositlerin immün aktivasyonu, yangı sırasında mikroglia tepkisini şekillendirmede önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir (Boccazzi vd., 2021). Akut olgularda HMGB1'in, oligodentrositlerden yoğun ekspresyonunun mikroglialarda immün yanıtı şiddetlendirebileceğini düşündürmüştür.

HMGB1'in subelüler yerleşimi proteinin fonksiyonu ile doğrudan ilişkilidir. Çalışmamızda oligodentrositlerde, akut olgularda daha çok nüklear ve sitoplazmik iken kronik olgularda daha çok sitoplazmik yerleşimli olduğu görülmüştür. İkili immunfloresan teknikte, kronik vakalarda hücrelerdeki en düşük ekspresyonu proteinin ekstraselüler bölgeye salınmış olabileceğini düşündürmüştür.

Merkezi sinir sistemini etkileyen hastalıklar insanlarda ve hayvanlarda yüksek mortalite ile seyreder (Oeverman vd., 2010b). Beynin karmaşık yapısından dolayı birçok yangısal ve dejeneratif hastalığın patogenezi henüz aydınlatılamamıştır. Sinir sistemini etkileyen hastalıklarda HMGB1'in rolünün incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. MSS'nde HMGB1 ile ilgili yapılan çalışmalar, büyük ölçüde HMGB1'in bağışıklık fonksiyonuna odaklanmıştır. Crews vd. (2013) çalışmalarında alkol bağımlılığında HMGB1'in beyin nöroimmün aktivasyonunu arttırdığını ortaya koymuşlardır. Frank vd. (2016a) yetişkin Sprague-Dawley ratlarında HMGB1'in, hasarlı nöronlardan salınması yolu ile metamfetaminin nöroinflamatuvar etkilerine kısmen aracılık ettiğini göstermişlerdir. Frank vd. (2016b), HMGB1'in moleküler formları olan fr-HMGB1 ve ds-HMGB1'in nöroinflamatuvar etkilerinin yanı sıra bağışıklık tehdidine karşı nöroinflamatuvar ve mikroglial yanıtı hazırlama yeteneğini inceledikleri çalışmalarında, ds-HMGB1'in bir bağışıklık tehdidine karşı mikroglial proinflamatuvar yanıtı doğrudan güçlendirdiğini göstermişlerdir. Benzer şekilde, Frank vd., (2015)'nin bir diğer çalışmalarında, HMGB1'in strese bağlı nöroinflamasyonda rolü olduğunu ve bağışıklık tepkisini güçlendirerek önemli bir hayatta kalma avantajı sağlayabileceği bildirilmiştir. İskemi sonrası rat beyninin incelendiği deneysel bir çalışmada, HMGB1'in iskemik beyinde parakrin ve otokrin bir şekilde sitokin benzeri bir araç olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (Kim vd., 2008). Bahsedilen çalışmalara benzer şekilde, çalışmamızda kontrollere göre artan düzeyde HMGB1 ekspresyonunun, koyunların *Listeria* ensefalitisinde kemotaktik ve proinflamatuvar

etkisi ile beyinde şekillenen lezyonların oluşum sürecinde HMGB1'in rolü olduğu düşünülmüştür.

Bakteriyel enfeksiyonlarda, HMGB1'in rolünün incelendiği çalışmalarda genellikle proteinin artan düzeyleri ile hastalığın prognozu ilişkilendirilmiştir. Şiddetli bakteriyel yumuşak doku enfeksiyonunun lokal bölgesinde, HMGB1'in bol miktarda bulunduğu ve dokudaki seviyelerinin enfeksiyonun şiddeti ile korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur (Johansson vd., 2014). Araştırmacılar tüberkülotik meningitis'li kişilerin serobrospinal sıvısında HMGB1'in mevcut olduğunu ve bu durumun MSS'indeki yangıyı yansıttığı sonucuna varmışlardır (Chen vd., 2016). Benzer şekilde, sütte HMGB1 konsantrasyonu ile mastitisin şiddeti arasında korelasyon olduğu ortaya konulmuştur (Furukawa vd., 2011). Heinola vd. (2013) sığırların kronik osteoartritisini inceledikleri çalışmalarında hastalığın şiddeti arttıkça kondrositlerin sitoplazmasında daha fazla ifade edildiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, bazı hastalıklarda HMGB1'in prognozu belirlemedeki rolünü daha az güvenilir bulmuşlardır. Bu duruma örnek olarak, Karlsson vd. (2013) piyometralı köpeklerde sistemik HMGB1 konsantrasyonunun önemli ölçüde arttığını ortaya koymakla birlikte, hastalığın şiddetini tespit etme potansiyelini sınırlı olarak görmekteyiz.

Enfeksiyöz hastalıklarda hastalığın prognozunu etkileyen en önemli unsurun konakçı immun yanıtının olduğu bilinmektedir. İnsanları etkileyen SARS-Cov-2 enfeksiyonunda da konakçıda oluşan sitokin fırtınasının hastalığa bağlı ölümlerde son derece etkili olduğu vurgulanmaktadır. Sitokin fırtınasının konakçıda yol açtığı hasar geri dönüşümsüz olarak doku hasarına neden olmakta ve konakçıda şekillendiği organ ve dokuya bağlı olarak semptomlara ve hatta mortaliteye neden olmaktadır. Eksojen HMGB1, alveolar epitel hücrelerinde SARS-CoV-2 giriş reseptörü olarak tanımlanan ACE2'nin ekspresyonunu indüklediği ortaya konulmuştur. Bu nedenle, HMGB1 inhibitörleri, COVID-19 hastalarının tedavisi için umut verici ilaç adayları olarak görülmektedir (Chen vd., 2020). Bu yönüyle oldukça güncel bir araştırma alanı bulan doğal bağışıklığın önemli elemanları olan sitokinler, hem hastalıkların patogenezi anlamada hem de onlara karşı terapötik mücadelede daha seçici olarak hedef gösterilmektedir. (Chen vd., 2020; Street, 2020). Listerial ensefalitiste beyinde şekillenen lezyonların hasara bağlı sitokinlerin sekonder etkisi olabileceği düşünülmekte birlikte tam olarak açıklanamamıştır. Bu yönüyle yapılan çalışmada proinflatuar bir sitokin olan HMGB1'in listerial ensefalitiste hücrelerden salınımı

gösterilmiş, lezyonların oluşum sürecinde katkısı olabileceğini düşündürmüştür.

HMGB1 nötralizasyonu, gen silme stratejileri veya kimyasal ajanlarla HMGB1'in fonksiyonlarının engellendiği çalışmalar, proteinin biyolojik süreçlerdeki rolünü göstermesi bakımından dikkat çekicidir. Volmari vd., (2019), gen silme stratejisi ve nötralizan antikolar kullanarak, karaciğerde nekroz sonrası HMGB1'in, listeria ile orta dereceli şiddetli enfeksiyon sırasında patojen savunması için vazgeçilmez olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma, HMGB1'in, *Listeria monocytogenes*'e karşı doğal bağışıklık tepkilerini kontrol etmesi bakımından sepsis için terapötik bir strateji olarak HMGB1 nötralizasyonuna karşı çıkmaktadır. Gao vd., (2020) glycyrrhizin, carbonexolone ve gen nakavt ile yaptıkları HMGB1 blokajlarının MSS nöronlarında bir etkiye neden olmadığını göstermişlerdir. Wang vd., (2020) *C. albicans* enfeksiyonunda HMGB1 ve etil pruvat (EP)'in rolünü araştırdıkları çalışmalarında, EP uygulamasının, HMGB1 seviyelerini inhibe ettiği, doku hasarını azalttığı ve hayatta kalma oranlarını arttırdığını bildirmişlerdir. Listerial ensefalitiste HMGB1'in bazı hücrelerden salınımını gösterdiğimiz çalışmamızın sonuçları enfeksiyonun prognozu için bu proteinin önemli olabileceğini düşündürmüştür. Ancak hedef proteinin blokajı ile hastalığın patogenezisindeki değişiklik değerlendirilmemiştir. Bu nedenle HMGB1 proteininin blokajı ile hastalıkla mücadele stratejisi belirlenmesi durumunda, patojenlere karşı konakçı savunması için HMGB1 proteinin kritik öneme sahip olduğu da gözardı edilmemelidir.

6. SONUÇ

Ruminantlarda, özellikle koyunlarda ensefalitise neden olan *Listeria* enfeksiyonu dünyanın farklı yerlerinde görülmektedir (Barlow ve McGorum, 1985; Bartt, 2000; Belchev, 1979; Braun vd., 2002; Campero vd., 2002; Olivier Disson ve Marc Lecuit, 2012; Dreyer vd., 2015; Gudmundsdottir vd., 2004; Haligur vd., 2019; Kotzamanidis vd., 2019; Mailles vd., 2011; Oevermann vd., 2010a; Vela vd., 2001; Wilesmith ve Gitter, 1986). Ülkemizde de kalitesiz silajla beslenmenin yapıldığı işletmelerde sıklıkla görüldüğü ve önemli ekonomik kayıplara yol açtığı birçok çalışmada vurgulanmıştır (Kennerman vd., 2005; Tutuncu vd., 2005).

Bu tez çalışmasında *Listeria* ile doğal enfekte koyun beyinlerinde proinflamatuvar bir sitokin olan HMGB1 proteinin ekspresyonu gösterilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, lezyonların oluşum sürecinde nöronlar, oligodentrositler ve mikrogliyal hücrelerde HMGB1 ekspresyonu görülmüştür. Akut olgularda oligodentrositlerden, subakut ve kronik olgularda ise mikrogliadan salınımının gösterilmesiyle yangıyı modüle ettiği söylenebilir. Astrositlerin bu hastalıkta HMGB1 ilişkili patogenezisinde çok fazla role sahip olmadıkları sonucuna varılabilir.

Üç ayrı hastalık veya sendrom olarak görülen Listeriozisin ensefalitis formunda doku hasarının mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (Cantile ve Youssef, 2016). Lezyonların oluşum sürecinde HMGB1 proteininin rolünün incelendiği bir çalışma bulunmaması bakımından bu çalışma önem arz etmektedir. Özellikle veteriner hekimlik alanında bu proteinin önemini gösteren çok az sayıda çalışma mevcuttur (Duan vd., 2014; Furukawa vd., 2011). Bu yönüyle yapılan çalışma veteriner sahada hastalıklara yaklaşımda bir farkındalık oluşturması hedeflenmektedir.

Otoimmün hastalıklar, kanser, travma ve enfeksiyon hastalıklarda hastalığın prognozunu belirleyen bir biyobelirteç veya terapötik hedef olarak görülen HMGB1 proteinini anlamaya yönelik yapılan çalışmalar son yıllarda ivme kazanmıştır (Vénéreau vd., 2016). Hücrenin dışına çıktıktan sonra konakçı inflamatuvar tepkilerini tetikleyen endojen bir alarmin olarak görev yapan bu protein, bu yönüyle enfeksiyonlar sırasında baskılanması ya da indüklenmesi yoluyla hastalıkların tedavisi için hedeflenebilir (Hernandez-Pando vd., 2015; Maroso vd., 2010; Paudel vd., 2018; Wang vd., 2019).

Hücre içi HMGB1 biyolojisini düzenlemeye yönelik terapötik müdahaleler için,

yine de hücre içi HMGB1 işlevlerinin daha derin bir şekilde anlaşılmasına ve araştırılmasına gereksinim duyulmaktadır. HMGB1 antagonistlerinin fonksiyonel biyoaktivitesini değerlendirmek ve daha sağlam tahliller oluşturmak için gelecekteki çalışmalara ihtiyaç vardır. HMGB1'den kaynaklanan MSS'ndeki doku hasarının mekanizmasına farklı sinyal yolları da neden olabilir. Bu mekanizmaları anlamak, araştırmacıların nöroenflamatuvar hastalıklar için yeni terapötik hedefler keşfetmesine yardımcı olabilir.

HMGB1 aracılı patolojik mekanizmalar büyük ölçüde anlaşılmaz kalmıştır. Bu mekanizmaların ortaya konmasının nörolojik hastalıklar için terapötik hedeflerin belirlenmesine olanak sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdlla, O. A., Elboshy, M. E., Reisha, E. F., Gadlla, H. A. ve El-Khodery, S. A. (2015). Tumor Necrosis Factor-alpha, Interleukins-12(p40), 6, and 10 levels in cerebrospinal fluid and outcome prediction in Ossimi sheep with encephalitic listeriosis. *Cytokine*; 73(2), 283-287. doi:10.1016/j.cyto.2015.03.004
- Abram, M., and M. Doric. (1997). Primary *Listeria monocytogenes* infection in gestating mice. *Folia Microbiol.* 42:65–71
- Al-Swailem AA, Al-Dubaib MA, Al-Ghamdi G, Al-Yamani E, Al-Naeem AM, Al-Mejali A, Shehata M, Hashad ME, Aboelhassan DE, Mahmoud OM.(2010). Cerebral listeriosis in a she-camel at Qassim Region, Central Saudi Arabia - a case report. *Vet Arhiv.* 80:539-547.
- Al-Obaidi, M. M. J. ve Desa, M. N. M. (2018). Mechanisms of Blood Brain Barrier Disruption by Different Types of Bacteria, and Bacterial-Host Interactions Facilitate the Bacterial Pathogen Invading the Brain. *Cell Mol Neurobiol*; 38(7), 1349-1368. doi:10.1007/s10571-018-0609-2
- Allerberger, F. (2003). *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*; 35(3), 183-189. doi:10.1016/s0928-8244(02)00447-9
- Andersson, U., Antoine, D. J. ve Tracey, K. J. (2014). The functions of HMGB1 depend on molecular localization and post-translational modifications. *J Intern Med*; 276(5), 420-424. doi:10.1111/joim.12309
- Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A. C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., and Tracey, K. J. (2000). High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med*; 192(4), 565-570. doi:10.1084/jem.192.4.565
- Andersson, U., Yang, H. ve Harris, H. (2018). Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets*; 22(3), 263-277. doi:10.1080/14728222.2018.1439924
- Andersson, U., Erlandsson-Harris, H., Yang, H. and Tracey, KJ., (2002). HMGB1 as a DNA-binding cytokine, *J. Leukoc. Biol* 72 1084–1091. [PubMed: 12488489]
- Andersson, U., Ottestad, W., & Tracey, K. J. (2020). Extracellular HMGB1: a therapeutic target in severe pulmonary inflammation including COVID-19 *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 26(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00172-4>
- Atkinson, E. (1917). Meningitis Associated With Gram-Positive Bacilli Of Diphtheroid Type. *Medical Journal of Australia*; 1(6), 115-118. doi:<https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1917.tb101462.x>
- Baetz, A. L., Wesley, I. V. and Stevens, M. G. (1996). The use of listeriolysin O in an ELISA, a skin test and a lymphocyte blastogenesis assay on sheep experimentally infected with *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* or *Listeria innocua*. *Vet Microbiol*; 51(1-2), 151-159. doi:10.1016/0378-1135(96)00033-8
- Banchereau, J. ve Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*; 392(6673), 245-252. doi:10.1038/32588
- Bancroft, G. J., Schreiber, R. D. ve Unanue, E. R. (1991). Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev*; 124, 5-24. doi:10.1111/j.1600-065x.1991.tb00613.x
- Barlow, R. M. ve McGorum, B. (1985). Ovine listerial encephalitis: analysis, hypothesis and synthesis. *Vet Rec*; 116(9), 233-236. doi:10.1136/vr.116.9.233

- Bartt, R. (2000). Listeria and atypical presentations of Listeria in the central nervous system. *Semin Neurol*; 20(3), 361-373. doi:10.1055/s-2000-9398
- Belchev, L. [Listeria enzootic in newborn lambs]. *Vet Med Nauki* 1979; 16(3), 57-62.
- Bennett, M. L., & Bennett, F. C. (2020). The influence of environment and origin on brain resident macrophages and implications for therapy. *Nature neuroscience*, 23(2), 157–166. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0545-6>
- Bhardwaj, V., Kanagawa, O., Swanson, P. E. ve Unanue, E. R. (1998). Chronic Listeria infection in SCID mice: requirements for the carrier state and the dual role of T cells in transferring protection or suppression. *J Immunol*; 160(1), 376-384.
- Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*; 81(1), 1-5. doi:10.1189/jlb.0306164
- Bianchi, M. E. ve Agresti, A. (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev*; 15(5), 496-506. doi:10.1016/j.gde.2005.08.007
- Bierne H, Sabet C, Personnic N, Cossart P. (2007). Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in Listeria monocytogenes. *Microbes Infect*. 9:1156-1166.
- Biragyn, A., Ruffini, P. A., Leifer, C. A., Klyushnenkova, E., Shakhov, A., Chertov, O., Kwak, L. W. (2002). Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science*; 298(5595), 1025-1029. doi:10.1126/science.1075565
- Biragyn, A., Surenhu, M., Yang, D., Ruffini, P. A., Haines, B. A., Klyushnenkova, E., Kwak, L. W. (2001). Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol*; 167(11), 6644-6653. doi:10.4049/jimmunol.167.11.6644
- Blériot, C., Dupuis, T., Jouvion, G., Eberl, G., Disson, O., & Lecuit, M. (2015). Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity*, 42(1), 145–158. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.020>
- Bocazzi, M., Van Steenwinckel, J., Schang, A. L., Faivre, V., Le Charpentier, T., Bokobza, C., Csaba, Z., Verderio, C., Fumagalli, M., Mani, S., & Gressens, P. (2021). The immune-inflammatory response of oligodendrocytes in a murine model of preterm white matter injury: the role of TLR3 activation. *Cell death & disease*, 12(2), 166. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03446-9>
- Bortolussi, R., N. Campbell, and V. Krause. (1984). Dynamics of Listeria monocytogenes type 4b infection in pregnant and infant rats. *Clin. Investig. Med*. 7:273–279.
- Braun, L., Ghebrehiwet, B. and Cossart, P. (2000), gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *The EMBO Journal*, 19: 1458-1466. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1458>
- Braun, U., Stehle, C. ve Ehrensperger, F. Clinical findings and treatment of listeriosis in 67 sheep and goats. *Vet Rec* 2002; 150(2), 38-42. doi:10.1136/vr.150.2.38
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., ... & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *science*, 303(5663), 1532-1535.
- Briones, V., Dominguez, L., Domingo, M., Marco, A., Ramos, J. A., Garcia, J. A. ve Suarez, G. (1989). Serological diagnosis of listeriosis in man, sheep and rabbit by immunoperoxidase technique. *Acta Microbiol Hung*; 36(2-3), 315-319.

- Brown, M. P., Trumble, T. N. ve Merritt, K. A. (2009). High-mobility group box chromosomal protein 1 as a potential inflammatory biomarker of joint injury in Thoroughbreds. *Am J Vet Res*; 70(10), 1230-1235. doi:10.2460/ajvr.70.10.1230
- Brzoza, K. L., Rockel, A. B. ve Hiltbold, E. M. (2004). Cytoplasmic entry of *Listeria monocytogenes* enhances dendritic cell maturation and T cell differentiation and function. *J Immunol*; 173(4), 2641-2651. doi:10.4049/jimmunol.173.4.2641
- Buchrieser, C. (2007). Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *Microbes and infection*; 9(10), 1147-1155. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.002
- Burdarov, I. ve Savova-Burdarova, S. (1976). Bacteriological and pathohistological studies of sheep experimentally infected with *Listeria*. *Vet Med Nauki*; 13(1), 63-70.
- Burdarov, I. ve Savova-Burdarova, S. (1977). Hematologic and histochemical changes in the bodies of sheep experimentally infected with listeriae. *Vet Med Nauki*; 14(5), 19-23.
- Burdarov, I. ve Savova-Burdarova, S. (1987). Seasonal dynamics and the prevention of the meningoencephalitic form of listeriosis in lambs. *Vet Med Nauki*; 24(8), 23-27.
- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L. ve Cossart, P. (2002). Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol*; 10(5), 238-245. doi:10.1016/s0966-842x(02)02342-9
- Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leit~ao, E., Sousa, S., Cabanes, D. (2011). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*. 2:379-394.
- Camejo, A., Buchrieser, C., Couvé, E., Carvalho, F., Reis, O., Ferreira, P., Sousa, S., Cossart, P., & Cabanes, D. (2009). In vivo transcriptional profiling of *Listeria monocytogenes* and mutagenesis identify new virulence factors involved in infection. *PLoS pathogens*, 5(5), e1000449. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000449>
- Campero, C. M., Odeon, A. C., Cipolla, A. L., Moore, D. P., Poso, M. A. ve Odriozola, E. (2002). Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*; 49(8), 379-383. doi:10.1046/j.1439-0450.2002.00586.x
- Cantile, C. ve Youssef, S. (2016). Chapter 4 - Nervous System. M. Grant Maxie (Editör), Jubb, Kennedy & Palmer's *Pathology of Domestic Animals: Volume 1 (Sixth Edition)* (s. 250-406): W.B. Saunders.; 250-406.
- Carrero, J. A., Calderon, B., & Unanue, E. R. (2006). Lymphocytes are detrimental during the early innate immune response against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Experimental Medicine*, 203(4), 933-940. doi:10.1084/jem.20060045
- Charlton, K. M. (1977). Spontaneous listeric encephalitis in sheep. Electron microscopic studies. *Vet Pathol*; 14(5), 429-434. doi:10.1177/030098587701400501
- Charoensup, J., Sermswan, R. W., Paeyao, A., Promakhejohn, S., Punasee, S., Chularari, C., Wongratanacheewin, S. (2014). High HMGB1 level is associated with poor outcome of septicemic melioidosis. *Int J Infect Dis*; 28, 111-116. doi:10.1016/j.ijid.2014.07.025
- Charpentier, E. ve Courvalin, P. (1999). Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*; 43(9), 2103-2108. doi:10.1128/AAC.43.9.2103
- Chávez-Arroyo, A., & Portnoy, D. A. (2020). Why is *Listeria monocytogenes* such a potent inducer of CD8+T-cells. *Cellular microbiology*, 22(4), e13175. <https://doi.org/10.1111/cmi.13175>
- Chen, R., Huang, Y., Quan, J., Liu, J., Wang, H., Billiar, T. R., Tang, D. (2020). HMGB1 as

- apoptical biomarker and therapeutic target for severe COVID-19. *Heliyon*; 6(12), e05672. doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05672>
- Chen, Y., Zhang, J., Wang, X., Wu, Y., Zhu, L., Lu, L., Qin, Y. (2016). HMGB1 level in cerebrospinal fluid as a complimentary biomarker for the diagnosis of tuberculous meningitis. *Springerplus*; 5(1), 1775. doi:10.1186/s40064-016-3478-5
- Chen, X., Zhang, J., Kim, B., Jaitpal, S., Meng, S. S., Adjepong, K. & Stonestreet, B. S. (2019). High-mobility group box-1 translocation and release after hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Experimental neurology*, 311, 1-14.
- Choi, J. Y. ve Kim, B. G. (2017). Toll-like Receptor 2: A Novel Therapeutic Target for Ischemic White Matter Injury and Oligodendrocyte Death. *Exp Neurobiol*; 26(4), 186-194. doi:10.5607/en.2017.26.4.186
- Coco, D. L., Veglianesi, P., Allievi, E., & Bendotti, C. (2007). Distribution and cellular localization of high mobility group box protein 1 (HMGB1) in the spinal cord of a transgenic mouse model of ALS. *Neuroscience letters*, 412(1), 73-77.
- Conlan, J. C. and R. J. North. (1991). Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J. Exp. Med.* 174:741–744.
- Conlan, J. W. and R. J. North. (1992). Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis* and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect. Immun.* 60:5164–5171.
- Cossart P. (2011). Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), 19484–19491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112371108>
- Cousens, L. P., and Wing, E. J. (2000). Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. *Immunol. Rev.* 174:150–159.
- Crews, F. T., Qin, L., Sheedy, D., Vetreno, R. P. ve Zou, J. (2013). High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence. *Biol Psychiatry*; 73(7), 602-612. doi:10.1016/j.biopsych.2012.09.030
- Czuprynski, C. J., Brown, J. F., Wagner, R. D., & Steinberg, H. (1994). Administration of antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 prevents expression of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* infection in previously immunized mice. *Infection and immunity*, 62(11), 5161-5163.
- Daugelat, S., Ladel, C. H., Schoel, B. ve Kaufmann, S. H. (1994). Antigen-specific T-cell responses during primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun*; 62(5), 1881-1888. doi:10.1128/iai.62.5.1881-1888.1994
- de las Heras, A., Cain, R. J., Bielecka, M. K. ve Vázquez-Boland, J. A. (2011). Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Curr Opin Microbiol*; 14(2), 118-127. doi:10.1016/j.mib.2011.01.005
- De Chastellier, C., and Berche, P. (1994). Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Infect. Immun.* 62:543–553
- Deckert, M., Virna, S., Sakowicz-Burkiewicz, M., Lütjen, S., Soltek, S., Bluethmann, H. ve Schlüter, D. (2007). Interleukin-1 receptor type 1 is essential for control of cerebral but not systemic listeriosis. *The American journal of pathology*; 170(3), 990-1002. doi:10.2353/ajpath.2007.060507
- Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Shabbir, M. Z., Barbuddhe, S., Malik, S. V. S. ve Singh, R. (2015). Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis)

- and advances in diagnosis and control: A comprehensive review. *The Veterinary quarterly*; 35. doi:10.1080/01652176.2015.1063023
- Di Palma, S., Brunetti, B., Doherr, M. G., Forster, U., Hilbe, M., Zurbriggen, A., Oevermann, A. (2012). Comparative spatiotemporal analysis of the intrathecal immune response in natural listeric rhombencephalitis of cattle and small ruminants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*; 35(5), 429-441. doi:10.1016/j.cimid.2012.03.009
- Disson, O. ve Lecuit, M. (2012). Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Virulence*; 3(2), 213-221. doi:10.4161/viru.19586
- Dramsi, S. Biswas, I. Maguin, E. Braun, L. Mastroeni, P. and Cossart, P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Molecular Microbiology*, vol. 16, no.2, pp. 251–261,
- Dreyer, M., Aguilar-Bultet, L., Rupp, S., Guldemann, C., Stephan, R., Schock, A., Oevermann, A. (2016). *Listeria monocytogenes* sequence type 1 is predominant in ruminant rhombencephalitis. *Sci Rep*; 6, 36419. doi:10.1038/srep36419
- Dreyer, M., Thomann, A., Bottcher, S., Frey, J. ve Oevermann, A. (2015). Outbreak investigation identifies a single *Listeria monocytogenes* strain in sheep with different clinical manifestations, soil and water. *Vet Microbiol* 179(1-2), 69-75. doi:10.1016/j.vetmic.2015.01.025
- Drevets D.A. Leenen PJM Greenfield R.A. (2004) Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. *Clin Microbiol Rev* 17: 323–347.
- Duan, E., Wang, D., Luo, R., Luo, J., Gao, L., Chen, H., Xiao, S. (2014). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection triggers HMGB1 release to promote inflammatory cytokine production. *Virology*; 468-470, 1-9. doi:https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.046
- Dumitriu, I. E., Bianchi, M. E., Bacci, M., Manfredi, A. A. and Rovere-Querini, P. (2007). The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells. *J Leukoc Biol*; 81(1), 84-91. doi:10.1189/jlb.0306171
- Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J., & Cossart, P. (2004). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual review of microbiology*, 58, 587–610. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090934>
- Dzaman, K., Zagor, M., Molinska-Glura, M. ve Krzeski, A. (2015). High motility group box 1 (HMGB1) protein and its receptor for advanced glycation end products (RAGE) expression in chronic rhinosinusitis without nasal polyps. *Folia Histochem Cytobiol*; 53(1), 70-78. doi:10.5603/FHC.a2015.0007
- Edelson, B. T. ve Unanue, E. R. (2000). Immunity to *Listeria* infection. *Curr Opin Immunol*; 12(4), 425-431. doi:10.1016/s0952-7915(00)00112-6
- Edelson, B. T., & Unanue, E. R. (2001). Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. *Immunity*, 14(5), 503–512. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00139-x](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00139-x)
- Fang, P., Schachner, M., & Shen, Y. Q. (2012). HMGB1 in development and diseases of the central nervous system. *Molecular neurobiology*, 45(3), 499–506. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8264-y>
- Farber, J. M. ve Peterkin, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 1991; 55(3), 476-511.
- Feng, Y., Yao, H., Chen, S., Sun, X., Yin, Y. ve Jiao, X. (2020). a. Rapid Detection of Hypervirulent Serovar 4h *Listeria monocytogenes* by Multiplex PCR. *Frontiers in microbiology*; 11, 1309-1309. doi:10.3389/fmicb.2020.01309
- Fleming, S. D., and P. A. Campbell. (1997). Some macrophages kill *Listeria monocytogenes* while others do not. *Immunol. Rev.* 158:69–77.

- Frande-Cabanes, E., Fernandez-Prieto, L., Calderon-Gonzalez, R., Rodríguez-Del Río, E., Yañez-Díaz, S., López-Fanarraga, M., & Alvarez-Domínguez, C. (2014). Dissociation of innate immune responses in microglia infected with *Listeria monocytogenes*. *Glia*, *62*(2), 233-246.
- Frank, M. G., Weber, M. D., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2015). Stress sounds the alarmin: The role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. *Brain, behavior, and immunity*, *48*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.03.010>
- Frank, M. G., Adhikary, S., Sobesky, J. L., Weber, M. D., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2016a). The danger-associated molecular pattern HMGB1 mediates the neuroinflammatory effects of methamphetamine. *Brain, behavior, and immunity*, *51*, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.001>
- Frank, M. G., Weber, M. D., Fonken, L. K., Hershman, S. A., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2016b). The redox state of the alarmin HMGB1 is a pivotal factor in neuroinflammatory and microglial priming: A role for the NLRP3 inflammasome. *Brain, behavior, and immunity*, *55*, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.10.009>
- Forrester, J. V., McMenamin, P. G., & Dando, S. J. (2018). CNS infection and immune privilege. *Nature reviews. Neuroscience*, *19*(11), 655–671. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0070-8>
- Fu, L., Liu, K., Wake, H., Teshigawara, K., Yoshino, T., Takahashi, H., & Nishibori, M. (2017). Therapeutic effects of anti-HMGB1 monoclonal antibody on pilocarpine-induced status epilepticus in mice. *Scientific reports*, *7*(1), 1-13.
- Fujita, K., Motoki, K., Tagawa, K., Chen, X., Hama, H., Nakajima, K., & Okazawa, H. (2016). HMGB1, a pathogenic molecule that induces neurite degeneration via TLR4-MARCKS, is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *Scientific reports*, *6*(1), 1-15.
- Furukawa, Y., Hayashi, T., Mizuta, M., Ebara, S., Kiku, Y., Ozawa, T., Mizuta, R. (2011). Increased concentration of high-mobility group box 1 protein in milk is related to the severity of bovine mastitis. *Veterinary Research Communications*; *35*(1), 47-54. doi:10.1007/s11259-010-9454-6
- Gaillard, J.-L. Berche, P. Frehel, C. Gouin, E. and Cossart, P. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*, vol. 65, no. 7, pp. 1127–1141,
- Gallucci, S. ve Matzinger, P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology*; *13*(1), 114-119. doi:[https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00191-6](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00191-6)
- Gao, S. Q., Zhang, H., He, J. G., Zheng, H. L., Zhang, P. W., Xu, J. F., Chen, J. G. (2020). Neuronal HMGB1 in nucleus accumbens regulates cocaine reward memory. *Addict Biol*; *25*(2), e12739. doi:10.1111/adb.12739
- Gao, T. L., Yuan, X. T., Yang, D., Dai, H. L., Wang, W. J., Peng, X., & Fu, Z. J. (2012). Expression of HMGB1 and RAGE in rat and human brains after traumatic brain injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, *72*(3), 643-649.
- Gasanov, U., Hughes, D. ve Hansbro, P. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review. *FEMS microbiology reviews*; *29*, 851-875. doi:10.1016/j.femsre.2004.12.002
- Gill, D. A. (1937). Ovine Bacterial Encephalitis (Circling Disease) and the Bacterial Genus *Listerella*. *Australian Veterinary Journal*; *13*(2), 46-56. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1937.tb01148.x>

- Goodwin, G. H., Sanders, C. ve Johns, E. W. (1973). A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *European Journal of Biochemistry*; 38(1), 14-19. doi:10.1111/j.1432-1033.1973.tb03026.x
- Gouin E, Adib-Conquy M, Balestrino D, Nahori MA, Villiers V, Colland F, Dramsi S, Dussurget O, Cossart P. (2010). The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the IkappaB kinase subunit IKKalpha. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:17333-17338.
- Granier, S. A., Moubareck, C., Colaneri, C., Lemire, A., Roussel, S., Dao, T. T., Brisabois, A. (2011). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol*; 77(8), 2788-2790. doi:10.1128/aem.01381-10
- Gray, M., Freitag, N. ve Boor, K. (2006). How the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* Mediates the Switch from Environmental Dr. Jekyll to Pathogenic Mr. Hyde. *Infection and immunity*; 74, 2505-2512. doi:10.1128/IAI.74.5.2505-2512.2006
- Gray, M. L. ve Killinger, A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological reviews*; 30(2), 309-382.
- Gray, M. L., C. Singh, and F. Thorp, Jr. (1955). Abortion, stillbirth, early death of young rabbits by *Listeria monocytogenes*. II. Oral exposure. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 89:169–175
- Gregory, S. H. and Wing, E. J. (1990). Accessory function of Kupffer cells in the antigen-specific blastogenic response of an L3T4⁺ T-lymphocyte clone to *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 58:2313–2319.
- Gregory, S. H. and Liu, C. C. (2000). CD8⁺ T-cell-mediated response to *Listeria monocytogenes* taken up in the liver and replicating within hepatocytes. *Immunol. Rev.* 174:112–122.
- Gregory, S. H., Barczynski, L. K. and Wing, E. J. (1992). Effector function of hepatocytes and Kupffer cells in the resolution of systemic bacterial infections. *J. Leukocyte Biol.* 51:421–424
- Grover, A., Taylor, J., Troudt, J., Keyser, A., Sommersted, K., Schenkel, A. and Izzo, A. A. Mycobacterial infection induces the secretion of high-mobility group box 1 protein. (2008). *Cellular Microbiology*; 10(6), 1390-1404. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01135.x
- Gudding, R., Gronstol, H. and Larsen, H. J. (1985). Vaccination against listeriosis in sheep. *Vet Rec*; 117(4), 89-90. doi:10.1136/vr.117.4.89
- Gudding, R., Nesse, L. L. ve Gronstol, H. (1989). Immunisation against infections caused by *Listeria monocytogenes* in sheep. *Vet Rec*; 125(5), 111-114. doi:10.1136/vr.125.5.111
- Gudmundsdottir, K. B., Aalbaek, B., Sigurdarson, S. ve Gunnarsson, E. (2004). The diversity of *Listeria monocytogenes* strains from 10 Icelandic sheep farms. *J Appl Microbiol*; 96(5), 913-921. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02183.x
- Guleria, I., & Pollard, J. W. (2001). Aberrant macrophage and neutrophil population dynamics and impaired Th1 response to *Listeria monocytogenes* in colony-stimulating factor 1-deficient mice. *Infection and immunity*, 69(3), 1795-1807.
- Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I. and Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*; 119(6), 753-766. doi:10.1016/j.cell.2004.11.038

- Haligur, M., Aydogan, A., Ozmen, O. ve Ipek, V. (2019). Immunohistochemical evaluation of natural cases of encephalitic listeriosis in sheep. *Biotech Histochem*; 94(5), 341-347. doi:10.1080/10520295.2019.1571225
- Hamon, M., Bierne, H., & Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature reviews. Microbiology*, 4(6), 423–434. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1413>
- Hamon, M.A., Batsche, E., Regnault, B., Tham, T.N., Seveau, S., Muchardt, C., Cossart, P. (2007). Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:13467–13472.
- Hamon, M.A., Cossart, P. (2011). KC efflux is required for histone H3 dephosphorylation by *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and other pore-forming toxins. *Infect Immun*. 79:2839-2846.
- Harty, J. T. ve Badovinac, V. P. Influence of effector molecules on the CD8⁺ T cell response to infection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14(3), 360-365. doi:10.1016/s0952-7915(02)00333-3
- Haruma, J., Teshigawara, K., Hishikawa, T., Wang, D., Liu, K., Wake, H., & Nishibori, M. (2016). Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody attenuates delayed cerebral vasospasm and brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Scientific reports*, 6(1), 1-13
- Hauf, N., Goebel, W., Fiedler, F., Sokolovic, Z. ve Kuhn, M. (1997). *Listeria monocytogenes* infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF-kappaB (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by IkappaBalpha and IkappaBbeta degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 94(17), 9394-9399. doi:10.1073/pnas.94.17.9394
- Havell, E. A. (1986). Augmented induction of interferons during *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Infectious Diseases*, 153(5), 960-969.
- Havell, E. A. (1987). Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis. *The Journal of Immunology*, 139(12), 4225-4231.
- Hayashi, T., Nagai, S., Fujii, H., Baba, Y., Ikeda, E., Kawase, T. ve Koyasu, S. (2009). Critical roles of NK and CD8⁺ T cells in central nervous system listeriosis. *J Immunol*; 182(10), 6360-6368. doi:10.4049/jimmunol.0803798
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 410:1099-1103.
- Headley, S. A., Bodnar, L., Fritzen, J. T., Bronkhorst, D. E., Alfieri, A. F., Okano, W., & Alfieri, A. A. (2014). Histopathological and molecular characterization of encephalitic listeriosis in small ruminants from northern Paraná, Brazil. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 44(3), 889–896. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822013000300036>
- Heinola, T., de Grauw, J. C., Virkki, L., Kontinen, A., Raulo, S. M., Sukura, A. ve Kontinen, Y. T. Bovine chronic osteoarthritis causes minimal change in synovial fluid. *J Comp Pathol* 2013; 148(4), 335-344. doi:10.1016/j.jcpa.2012.08.001
- Hernandez-Pando, R., Barrios-Payan, J., Mata-Espinosa, D., Marquina-Castillo, B., Hernandez-Ramirez, D., Bottasso, O. A. ve Bini, E. I. The Role of High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) in the Immunopathology of Experimental Pulmonary Tuberculosis. *PLoS One* 2015; 10(7), e0133200. doi:10.1371/journal.pone.0133200
- Hinomatsu, K., Yoshikai, Y., Matsuzaki, G., Ohga, S., Muramori, K., Matsumoto, K., &

- Nomoto, K. (1992). A protective role of gamma/delta T cells in primary infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *The Journal of experimental medicine*, 175(1), 49-56.
- Hock, R., Furusawa, T., Ueda, T. ve Bustin, M. (2007). HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol*; 17(2), 72-79. doi:10.1016/j.tcb.2006.12.001
- Hoge, J., Yan, I., Jänner, N., Schumacher, V., Chalaris, A., Steinmetz, O. M., Engel, D. R., Scheller, J., Rose-John, S., & Mittrücker, H. W. (2013). IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md.:1950)*, 190(2), 703–711. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201044>
- Hoppe, G., Talcott, K. E., Bhattacharya, S. K., Crabb, J. W. and Sears, J. E. (2006). Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgb1. *Exp Cell Res*; 312(18), 3526-3538. doi:10.1016/j.yexcr.2006.07.020
- Hori, O., Brett, J., Slattery, T., Cao, R., Zhang, J., Chen, J. X. (1995). The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem*; 270(43), 25752-25761. doi:10.1074/jbc.270.43.25752
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., & Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science*, 260(5107), 547-549.
- Huang, H., Yazdani, H., loughran, P. ve Tsung, A. Intracellular HMGB1 mediating neutrophil extracellular trap formation during liver sterile inflammation. *The Journal of Immunology* 2017; 198(1 Supplement), 222.227.
- Huang, M., Guo, M., Wang, K., Wu, K., Li, Y., Tian, T., Yang, H. (2020). HMGB1 Mediates Paraquat-Induced Neuroinflammatory Responses via Activating RAGE Signaling Pathway. *Neurotox Res*; 37(4), 913-925. doi:10.1007/s12640-019-00148-1
- Hulphers, G. (1911). Lefvernekros hos kanin orsakad af en ej forut beskrifven bakterie. *Sven. Vet. Tidskr.* 16:265-273. Reprinted: 1959, Medlemsbl. Sverige. *Vet. Forb.* 11 (Suppl.) :10-16
- Humann, J., Bjordahl, R., Andreasen, K., Lenz, L.L. (2007). Expression of the p60 autolysin enhances NK cell activation and is required for *Listeria monocytogenes* expansion in IFN gamma-responsive mice. *J Immunol.* 178:2407-2414
- Ilhan, F., Ulusoy, Y. ve Haligur, M. (2012). Matrix metalloproteinase expression in sheep with listerial meningoencephalitis. *Res Vet Sci*; 92(2), 269-272. doi:10.1016/j.rvsc.2011.01.019
- Immunofluorescence Double Staining Protocol - Sequential Approach for Primary Antibodies Raised from Same Species. (t.y) Erişim adresi http://www.ihcworld.com/protocols/general_IHC/immunofl_double_sequential.htm
- Ireton, K. (2007), Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. *Cellular Microbiology*, 9: 1365-1375. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00933.x>
- Ireton, K., Payrastra, B., Chap, H., Ogawa, W., Sakaue, H., Kasuga, M., & Cossart, P. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science*, 274(5288), 780-782.
- Ireton, K., Payrastra, B., & Cossart, P. (1999). The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 17025-17032.

- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), 584–640. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001>
- Jacquet, C., Doumith, M., Gordon, J. I., Martin, P. M., Cossart, P., & Lecuit, M. (2004). A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *The Journal of infectious diseases*, 189(11), 2094–2100. <https://doi.org/10.1086/420853>
- Janeway C. A., Jr (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology today*, 13(1), 11–16. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90198-G](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90198-G)
- Janko, C., Filipovic, M., Munoz, L. E., Schorn, C., Schett, G., Ivanovic-Burmazovic, I. ve Herrmann, M. (2014). Redox modulation of HMGB1-related signaling. *Antioxid Redox Signal*; 20(7), 1075-1085. doi:10.1089/ars.2013.5179
- Johansson, L., Snall, J., Sendi, P., Linner, A., Thulin, P., Linder, A., Norrby-Teglund, A. (2014). HMGB1 in severe soft tissue infections caused by *Streptococcus pyogenes*. *Front Cell Infect Microbiol*; 4, 4. doi:10.3389/fcimb.2014.00004
- Johansson J, Mandin P, Renzoni A, Chiaruttini C, Springer M, Cossart P. (2002). An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell*. 110:551-561
- Jones, D. (1990). Foodborne listeriosis. *Lancet*; 336(8724), 1171-1174. doi:10.1016/0140-6736(90)92778-g
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Lang, R. A. (2002). In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*; 17(2), 211-220. doi:10.1016/s1074-7613(02)00365-5
- Jung, J. H., Park, J. H., Jee, M. H., Keum, S. J., Cho, M. S., Yoon, S. K., & Jang, S. K. (2011). Hepatitis C virus infection is blocked by HMGB1 released from virus-infected cells. *Journal of virology*, 85(18), 9359-9368.
- Kamau, E., Takhampunya, R., Li, T., Kelly, E., Peachman, K. K., Lynch, J. A., Palmer, D. R. (2009). Dengue virus infection promotes translocation of high mobility group box 1 protein from the nucleus to the cytosol in dendritic cells, upregulates cytokine production and modulates virus replication. *J Gen Virol*; 90(Pt 8), 1827-1835. doi:10.1099/vir.0.009027-0
- Kang, R., Hou, W., Zhang, Q., Chen, R., Lee, Y. J., Bartlett, D. L., Zeh, H. J. (2014). RAGE is essential for oncogenic KRAS-mediated hypoxic signaling in pancreatic cancer. *Cell Death Dis* 5(10), e1480. doi:10.1038/cddis.2014.445
- Karayigit, MO. ve Dincel, GC. (2020). Role of ADAMTS-13 and nNOS expression in neuropathogenesis of listeric encephalitis of small ruminants, *Biotechnic & Histochemistry*, 95:8, 584-596, DOI: [10.1080/10520295.2020.1743359](https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1743359)
- Karlsson, I., Wernersson, S., Ambrosen, A., Kindahl, H., Sodersten, F., Wang, L. ve Hagman, R. (2013). Increased concentrations of C-reactive protein but not high-mobility group box 1 in dogs with naturally occurring sepsis. *Vet Immunol Immunopathol*; 156(1-2), 64-72. doi:10.1016/j.vetimm.2013.09.011
- Kawabata, H., Setoguchi, T., Yone, K., Souda, M., Yoshida, H., Kawahara, K., Maruyama, I., Komiya, S. (2010). High mobility group box 1 is upregulated after spinal cord injury and is associated with neuronal cell apoptosis. *Spine (Phila Pa 1976)* 35(11):1109–1115

- Kim, J. B., Lim, C. M., Yu, Y. M. ve Lee, J. K. (2008). Induction and subcellular localization of high-mobility group box-1 (HMGB1) in the postischemic rat brain. *J Neurosci Res*; 86(5), 1125-1131. doi:10.1002/jnr.21555
- Kim, J. B., Sig Choi, J., Yu, Y. M., Nam, K., Piao, C. S., Kim, S. W., Lee, J. K. (2006). HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *J Neurosci*; 26(24), 6413-6421. doi:10.1523/jneurosci.3815-05.2006
- Kokkola, R., Andersson, A., Mullins, G., Ostberg, T., Treutiger, C. J., Arnold, B., Harris, H. E. (2005). RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand J Immunol*; 61(1), 1-9. doi:10.1111/j.0300-9475.2005.01534.x
- Krueger, N., Low, C. ve Donachie, W. (1995). Phenotypic characterization of the cells of the inflammatory response in ovine encephalitic listeriosis. *J Comp Pathol*; 113(3), 263-275. doi:10.1016/s0021-9975(05)80041-6
- Kummeneje, K. (1975). *Listeria monocytogenes*. isolation from sheep and goats in northern Norway. serogrouping and some biochemical reactions. *Nord Vet Med*; 27(3), 140-143.
- Kursar, M., Bonhagen, K., Kohler, A., Kamradt, T., Kaufmann, S. H. ve Mittrucker, H. W. (2002). Organ-specific CD4⁺ T cell response during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*; 168(12), 6382-6387. doi:10.4049/jimmunol.168.12.6382
- Lebreton, A., Stavru, F., Brisse, S. ve Cossart, P. (2016). 1926–2016: 90 Years of listeriology. *Microbes and infection*; 18(12), 711-723. doi:https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.10.009
- Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Aguilhon, C. ve Lecuit, M. (2019). *Listeria thailandensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 69(1), 74-81. doi:https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003097
- Lepay, D. A., Nathan, C. F., Steinman, R. M., Murray, H. W. and Cohn, Z. A. (1985). Murine Kupffer cells. Mononuclear phagocytes deficient in the generation of reactive oxygen intermediates. *J. Exp. Med.* 161:1079–1096.
- Ley, C., Ekman, S., Roneus, B. ve Eloranta, M. L. (2009). Interleukin-6 and high mobility group box protein-1 in synovial membranes and osteochondral fragments in equine osteoarthritis. *Res Vet Sci*; 86(3), 490-497. doi:10.1016/j.rvsc.2008.10.008
- Lippmann, R. (1969). Results of various clinical and diagnostic as well as therapeutic studies in spontaneous brain listeriosis of the sheep. *Acta Vet Acad Sci Hung*; 19(2), 161-169.
- Li, J., Wang, H., Mason, J.M., Levine, J., Yu, M., Ulloa, L., Czura, C.J., Tracey, K.J., Yang, H. (2004). Recombinant HMGB1 with cytokine-stimulating activity, *J. Immunol Methods* 289 211–223. [PubMed: 15251426]
- Loncarevic S., Artursson K., Johansson I. (1999) A case of canine cutaneous listeriosis. *Veterinary Dermatology* 10, 69-71. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.1999.00127.x>
- Loeb, E. (2004). Encephalitic Listeriosis in Ruminants: Immunohistochemistry as a Diagnostic Tool. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 51: 453-455. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00656.x>
- Lotze, M.T. Tracey, K.J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal, *Nat. Rev. Immunol* 5 331–342. doi: 10.1038/nri1594.
- Low, J. C. and Donachie, W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J*; 153(1), 9-29. doi:10.1016/s1090-0233(97)80005-6
- Lu, B., Antoine, D. J., Kwan, K., Lundback, P., Wahamaa, H., Schierbeck, H., Tracey, K. J. (2014). JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear

- translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 111(8), 3068-3073. doi:10.1073/pnas.1316925111
- Lu, B., Wang, H., Andersson, U. ve Tracey, K. J. (2013). Regulation of HMGB1 release by inflammasomes. *Protein Cell*; 4(3), 163-167. doi:10.1007/s13238-012-2118-2
- Luft, B.J., and Remington, J.S. (1982). Effect of pregnancy on resistance to *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* infections in mice. *Infect. Immun.* 38:1164–1171.
- MacGowan, A. P., Bowker, K., McLauchlin, J., Bennett, P. M. ve Reeves, D. S. (1994). The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *Int J Food Microbiol*; 21(4), 325-334. doi:10.1016/0168-1605(94)90062-0
- Mackness, G. B. (1962). Cellular resistance to infection. *The Journal of experimental medicine*; 116, 381-406. doi:10.1084/jem.116.3.381
- Maudet, C., Levallois, S., Disson, O., & Lecuit, M. (2021). Innate immune responses to *Listeria* in vivo. *Current opinion in microbiology*, 59, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.11.006>
- Magna, M. ve Pisetsky, D. S. (2014). The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Molecular Medicine*; 20(1), 138-146. doi:10.2119/molmed.2013.00164
- Mandel, T. E., & Cheers, C. (1980). Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains. *Infection and immunity*, 30(3), 851-861.
- Marco, A. J., N. Prats, J. A. Ramos, V. Briones, M. Blanco, L. Domínguez, and M. Domingo. (1992). A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *J. Comp. Pathol.* 107:1–9.
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., & Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 440(7081), 228-232.
- Matta, B. M., Reichenbach, D. K., Blazar, B. R. ve Turnquist, H. R. (2017). Alarmins and Their Receptors as Modulators and Indicators of Alloimmune Responses. *American Journal of Transplantation*; 17(2), 320-327. doi:<https://doi.org/10.1111/ajt.13887>
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*; 12, 991-1045. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.005015
- Maury, M. M., Tsai, Y. H., Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francisque, V., Leclercq, A., Criscuolo, A., Gaultier, C., Roussel, S., Brisabois, A., Disson, O., Rocha, E., Brisse, S., & Lecuit, M. (2016). Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nature genetics*, 48(3), 308–313. <https://doi.org/10.1038/ng.3501>
- McCaffrey, R. L., Fawcett, P., O'Riordan, M., Lee, K. D., Havell, E. A., Brown, P. O. ve Portnoy, D. A. (2004). A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101(31), 11386-11391. doi:10.1073/pnas.0403215101
- McLauchlin, J. ve Low, J. C. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. *Vet Rec* 1994; 135(26), 615-617.
- Medzhitov, R. and Janeway, J. C. (2000). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology*; 8(10), 452-456. doi:[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01845-X](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01845-X)

- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M., Cossart, P. (1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*. 84:923-932.
- Merenmies, J., Pihlaskari, R., Laitinen, J., Wartiovaara, J. ve Rauvala, H. (1991). 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *J Biol Chem*; 266(25), 16722-16729.
- Mezzapelle, R., Venereau, E. ve Bianchi, M. E. (2019). Stress and Alarmins. Report from the 9th iD&EAs meeting. *Cell Death & Disease*; 10(12), 937. doi:10.1038/s41419-019-2165-1
- Mielke, M. E., Ehlers, S. ve Hahn, H. The role of cytokines in experimental listeriosis. *Immunobiology* 1993; 189(3-4), 285-315. doi:10.1016/s0171-2985(11)80363-3
- Miller, A. D., & Zachary, J. F. (2017). Nervous System. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 805–907.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00014-X>
- Mittrucker, H. W., Kohler, A. ve Kaufmann, S. H. (2000). Substantial in vivo proliferation of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes during secondary *Listeria monocytogenes* infection. *Eur J Immunol*; 30(4), 1053-1059. doi:10.1002/(sici)1521-4141(200004)30:4<1053::Aid-immu1053>3.0.Co;2-n
- Miyasho, T., Nakamura, K., Nomura, S., Kawasako, K., Nakade, T., Yamada, S. ve Yokota, H. (2011). High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Protein is Present in the Cerebrospinal Fluid of Dogs with Encephalitis. *Journal of Veterinary Medical Science*; 73(7), 917-922. doi:10.1292/jvms.10-0444
- Mullins, G. E., Sunden-Cullberg, J., Johansson, A. S., Rouhiainen, A., Erlandsson-Harris, H., Yang, H., Treutiger, C. J. (2004). Activation of human umbilical vein endothelial cells leads to relocation and release of high-mobility group box chromosomal protein 1. *Scand J Immunol*; 60(6), 566-573. doi:10.1111/j.0300-9475.2004.01518.x
- Murray, E. G. D., Webb, R. A. ve Swann, M. B. R. A. (1926). Disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*; 29(4), 407-439. doi:10.1002/path.1700290409
- Musumeci, D., Roviello, G. N. ve Montesarchio, D. (2014). An overview on HMGB1 inhibitors as potential therapeutic agents in HMGB1-related pathologies. *Pharmacol Ther*; 141(3), 347-357. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.11.001
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Yoshimori, T. (2004). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science*; 306(5698), 1037-1040. doi:10.1126/science.1103966
- Nakane, A., Yamada, K., Hasegawa, S., Mizuki, D., Mizuki, M., Sasaki, S. and Miura, T. (1999). Endogenous cytokines during a lethal infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *FEMS Microbiology Letters*; 175(1), 133-142. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13612.x
- Nakane, A., & Minagawa, T. (1984). The significance of alpha/beta interferons and gamma interferon produced in mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Cellular immunology*, 88(1), 29-40.
- Nie, Y., Yang, D. ve Oppenheim, J. J. (2016). Alarmins and Antitumor Immunity. *Clin Ther*; 38(5), 1042-1053. doi:10.1016/j.clinthera.2016.03.021
- Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., (2004). Wiedmann, M. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting

- ruminants and in the farm environment. *Applied and environmental microbiology*; 70(8), 4458-4467. doi:10.1128/AEM.70.8.4458-4467.2004
- Nishibori, M., Wang, D., Ousaka, D., & Wake, H. (2020). High Mobility Group Box-1 and Blood-Brain Barrier Disruption. *Cells*, 9(12), 2650. <https://doi.org/10.3390/cells9122650>
- Oevermann, A., Botteron, C., Seuberlich, T., Nicolier, A., Friess, M., Doherr, M. G. (2008). Vandevelde, M. Neuropathological survey of fallen stock: active surveillance reveals high prevalence of encephalitic listeriosis in small ruminants. *Vet Microbiol*; 130(3-4), 320-329. doi:10.1016/j.vetmic.2008.01.015
- Oevermann, A., Di Palma, S., Doherr, M. G., Abril, C., Zurbriggen, A. ve Vandevelde, M. (2010). Neuropathogenesis of naturally occurring encephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in ruminants. *Brain Pathol a*; 20(2), 378-390. doi:10.1111/j.1750-3639.2009.00292.x
- Oevermann, A., Zurbriggen, A. ve Vandevelde, M. (2010). Rhombencephalitis Caused by *Listeria monocytogenes* in Humans and Ruminants: A Zoonosis on the Rise Interdisciplinary perspectives on infectious diseases 632513-632513. doi:10.1155/2010/632513
- OIE. (2018). *Listeria monocytogenes*. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.; Chapter 3.9.6, 1-18.
- OIE. (2018). *Listeria monocytogenes*. Chapter 3.9.6. s. 1-18. Available from: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals>
- Oppenheim, J. J. ve Yang, D. (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology*; 17(4), 359-365. doi:<https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.06.002>
- Osebold, J. W., Kendrick, J. W. and Njoku-Obi, A. (1960). Abortion of cattle experimentally with *Listeria monocytogenes*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 137: 227–233.
- Otter, A. ve Blakemore, W. F. (1989). Observation on the presence of *Listeria monocytogenes* in axons. *Acta Microbiol Hung*; 36(2-3), 125-131.
- Otter, A., Houlihan, M. G., Daniel, R. G., Kirby, F. D., Schock, A. ve Higgins, R. J. (2004). Ovine gastrointestinal listeriosis. *Vet Rec*; 154(15), 479.
- Palmer, D. G. (1984). Enzootic septicemic listeriosis in a migrating flock of sheep. *Schweiz Arch Tierheilkd*; 126(10), 539-543.
- Palumbo, R., Sampaolesi, M., De Marchis, F., Tonlorenzi, R., Colombetti, S., Mondino, A., Cossu, G., & Bianchi, M. E. (2004). Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *The Journal of cell biology*, 164(3), 441–449. <https://doi.org/10.1083/jcb.200304135>
- Parida, S. K., Domann, E., Rohde, M., Müller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J., & Chakraborty, T. (1998). Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Molecular microbiology*, 28(1), 81–93. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00776.x>
- Paudel, Y. N., Shaikh, M. F., Chakraborti, A., Kumari, Y., Aledo-Serrano, Á., Aleksovska, K., Othman, I. (2018). HMGB1: A Common Biomarker and Potential Target for TBI, Neuroinflammation, Epilepsy, and Cognitive Dysfunction. *Front Neurosci*; 12, 628. doi:10.3389/fnins.2018.00628
- Paudel, Y. N., Angelopoulou, E., Piperi, C., Othman, I., & Shaikh, M. F. (2020). Implication of HMGB1 signaling pathways in Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): From molecular mechanisms to pre-clinical results. *Pharmacological research*, 104792.

- Personnic N, Bruck S, Nahori MA, Toledo-Arana A, Nikitas G, Lecuit M, Dussurget O, Cossart P, Bierne H. (2010). The stress-induced virulence protein InlH controls interleukin-6 production during murine listeriosis. *Infect Immun.* 78:1979-1989.
- Pfister, H., Remer, K. A., Brcic, M., Fatzer, R., Christen, S., Leib, S. ve Jungi, T. W. (2002). Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in listeric encephalitis: a cross-species study in ruminants. *Vet Pathol*; 39(2), 190-199. doi:10.1354/vp.39-2-190
- Pisetsky, D. (2011). Cell death in the pathogenesis of immune-mediated diseases: the role of HMGB1 and DAMP-PAMP complexes. *Swiss medical weekly* 141, w13256. doi:10.4414/smw.2011.13256
- Polle L, Rigano LA, Julian R, Ireton K, Schubert WD. (2014). Structural details of human tuba recruitment by InlC of *Listeria monocytogenes* elucidate bacterial cell-cell spreading. *Structure.* 22:304-314.
- Potel, K., Schleicher, J., Schneider, J., Gunther, H. ve Klaus, G. (1969). Pathogenesis of cerebral listeriosis of sheep. *Monatsh Veterinarmed*; 24(15), 575-579.
- Pron, B., C. Boumaila, F. Jaubert, S. Sarnacki, J.-P. Monnet, P. Berche, and J.-L. Gaillard. (1998). Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect. Immun.* 66:747-755.
- Qiu, Z., Khairallah, C. ve Sheridan, B. S. (2018). *Listeria Monocytogenes*: A Model Pathogen Continues to Refine Our Knowledge of the CD8 T Cell Response. *Pathogens*; 7(2), 55.
- Okuma, Y., Liu, K., Wake, H., Zhang, J., Maruo, T., Date, I., Yoshino, T., Ohtsuka, A., Otani, N., Tomura, S., Shima, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Takahashi, H. K., Mori, S., & Nishibori, M. (2012). Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Annals of neurology*, 72(3), 373-384. <https://doi.org/10.1002/ana.23602>
- Queiroz, M. L., Quadros, M. R. ve Santos, L. M. (2000). Cytokine profile and natural killer cell activity in *Listeria monocytogenes* infected mice treated orally with *Petiveria alliacea* extract. *Immunopharmacol Immunotoxicol*; 22(3), 501-518. doi:10.3109/08923970009026008
- Qu, Y., Zhan, Y., Yang, S., Ren, S., Qiu, X., Rehamn, Z. U., Tan, L., Sun, Y., Meng, C., Song, C., Yu, S., & Ding, C. (2018). Newcastle disease virus infection triggers HMGB1 release to promote the inflammatory response. *Virology*, 525, 19-31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.09.001>
- Rawool, D. B., Malik, S. V. S., Shakuntala, I., Sahare, A. M. ve Barbuddhe, S. B. (2007). Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. *International Journal of Food Microbiology*; 113(2), 201-207. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.029>
- Rich, K. A., Burkett, C. ve Webster, P. (2003). Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell Microbiol*; 5(7), 455-468. doi:10.1046/j.1462-5822.2003.00292.x
- Rogers, H. W., & Unanue, E. R. (1993). Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infection and immunity*, 61(12), 5090-5096.
- Rouhiainen, A., Kuja-Panula, J., Wilkman, E., Pakkanen, J., Stenfors, J., Tuominen, R. K., Lepäntalo, M., Carpén, O., Parkkinen, J., & Rauvala, H. (2004). Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). *Blood*, 104(4), 1174-1182. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3536>
- Rouquette, C. ve Berche, P. (1996). The pathogenesis of infection by *Listeria monocytogenes*. *Microbiologia*; 12(2), 245-258.

- Rovere-Querini, P., Capobianco, A., Scaffidi, P., Valentini, B., Catalanotti, F., Giazson, M., Manfredi, A. A. (2004). HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep*; 5(8), 825-830. doi:10.1038/sj.embor.7400205
- Rrapaj, E., Trisolini, E., Bertero, L., Salvo, M., Indelicato, R., Andorno, S., Boldorini, R. L. (2018). Expression analysis of HMGB1 in histological samples of malignant pleural mesothelioma. *Histopathology*; 72(6), 1039-1050. doi:10.1111/his.13470
- Ryser, E.T. and Donnelly, C.W. (2015). "35. Listeria", *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* DOI: 10.2105/MBEF.0222.040
- Sabet C, Toledo-Arana A, Personnic N, Lecuit M, Dubrac S, Poupel O, Poupel O, Gouin E, Nahori MA, Cossart P, Bierne H. (2008). The *Listeria monocytogenes* virulence factor InlJ is specifically expressed in vivo and behaves as an adhesin. *Infect Immun*. 76:1368-1378.
- Sanchez-Giraldo, R., Acosta-Reyes, F. J., Malarkey, C. S., Saperas, N., Churchill, M. E. A. ve Campos, J. L. (2015). Two high-mobility group box domains act together to underwind and kink DNA. *Acta Crystallographica Section D*; 71(7), 1423-1432. doi:doi:10.1107/S1399004715007452
- Sasaki, T., Liu, K., Agari, T., Yasuhara, T., Morimoto, J., Okazaki, M., & Date, I. (2016). Anti-high mobility group box 1 antibody exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 275, 220-231.
- Scaffidi, P., Misteli, T. ve Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*; 418(6894), 191-195. doi:10.1038/nature00858
- Schlafer, D. H., & Foster, R. A. (2016). Female Genital System. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 3*, 358–464.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5319-1.00015-3>
- Schluter, D., Buck, C., Reiter, S., Meyer, T., Hof, H. ve Deckert-Schluter, M. (1999). Immune reactions to *Listeria monocytogenes* in the brain. *Immunobiology*; 201(2), 188-195. doi:10.1016/s0171-2985(99)80058-8
- Schluter, D., Chahoud, S., Lassmann, H., Schumann, A., Hof, H. ve Deckert-Schluter, M. (1996). Intracerebral targets and immunomodulation of murine *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol*; 55(1), 14-24. doi:10.1097/00005072-199601000-00002
- Schmid, M., Ng, E., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., Schleifer, K. (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic and applied microbiology*; 28, 1-18. doi:10.1016/j.syapm.2004.09.005
- Schnupf, P., & Portnoy, D. A. (2007). Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microbes and infection*, 9(10), 1176–1187. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.005>
- Scott, P. R. (2013). Clinical diagnosis of ovine listeriosis. *Small Ruminant Research*, 110(2-3), 138-141. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.002>
- Segal A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology*, 23, 197–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>
- Seong, S. Y., & Matzinger, P. (2004). Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature reviews. Immunology*, 4(6), 469–478. <https://doi.org/10.1038/nri1372>
- Shen, H., Whitmire, J. K., Fan, X., Shedlock, D. J., Kaeck, S. M. ve Ahmed, R. (2003). A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant *Listeria monocytogenes*. *J Immunol*; 170(3), 1443-1451. doi:10.4049/jimmunol.170.3.1443

- Smith, G. A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N. C., Portnoy, D. A. ve Goldfine, H. (1995) The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infection and immunity*; 63(11), 4231-4237. doi:10.1128/IAI.63.11.4231-4237.1995
- Smutny, M. and Yap, A.S. (2010). Neighborly relations: cadherins and mechanotransduction. *J Cell Biol.* 189:1075-1077.
- Sterenczak, K., Kleinschmidt, S., Wefstaedt, P., Eberle, N., Hewicker-Trautwein, M., Bullerdiek, J., Murua Escobar, H. (2011). Quantitative PCR and Immunohistochemical Analyses of HMGB1 and RAGE Expression in Canine Disseminated Histiocytic Sarcoma (Malignant Histiocytosis). *Anticancer research*; 31, 1541-1548.
- Stevens, J. M., Galyov, E. E., & Stevens, M. P. (2006). Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nature reviews. Microbiology*, 4(2), 91–101. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1320>
- Staric´ J., Krizanec, F., Zadnik, T., (2008). *Listeria monocytogenes* keratoconjunctivitis and uveitis in dairy cattle. *Bull Vet Inst Pulawy.* 52:351-355.
- Stavru, F., Bouillaud, F., Sartori, A., Ricquier, D., Cossart, P. (2011). *Listeria monocytogenes* transiently alters mitochondrial dynamics during infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:3612-3617.
- Straino, S., Di Carlo, A., Mangoni, A., De Mori, R., Guerra, L., Maurelli, R., Panacchia, L., Di Giacomo, F., Palumbo, R., Di Campli, C., Uccioli, L., Biglioli, P., Bianchi, ME., Capogrossi, MC., Germani, A. (2008). Highmobility group box 1 protein in human and murine skin: involvement in wound healing, *J. Invest. Dermatol* 128 1545–1553.
- Street, M. E. (2020). HMGB1: A Possible Crucial Therapeutic Target for COVID-19? *Hormone research in paediatrics*; 93(2), 73-75. doi:10.1159/000508291
- Takeda, K. ve Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*; 17(1), 1-14. doi:10.1093/intimm/dxh186
- Ting, J. P., & Davis, B. K. (2005). CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 387-414.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., Loh, E., Gripenland, J., Tiensuu, T., Vaitkevicius, K., Barthelemy, M., Vergassola, M., Nahori, M. A., Soubigou, G., Régnauld, B., Coppée, J. Y., Lecuit, M., Johansson, J., & Cossart, P. (2009). The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature*, 459(7249), 950–956. <https://doi.org/10.1038/nature08080>
- Torres, D., Barrier, M., Bihl, F., Quesniaux, V. J., Maillet, I., Akira, S., Erard, F (2004). Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun*; 72(4), 2131-2139. doi:10.1128/iai.72.4.2131-2139.2004
- Tripp, C. S., Wolf, S. F., & Unanue, E. R. (1993). Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(8), 3725-3729.
- Troxler, R., Von Graevenitz, A., Funke, G., Wiedemann, B. ve Stock, I (2000). Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clinical Microbiology and Infection*; 6(10), 525-535. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00168.x>
- Tsige, T. Z. ve Dema, T. (2019). Listeriosis in Ruminants and its Zoonotic Importance: A Review. *Advances in Biological Research* 13 (2): 52-61. doi:10.5829/idosi.abr.2019.52.61

- Ugrinova, I. ve Pasheva, E. Chapter Two - HMGB1 Protein: A Therapeutic Target Inside and Outside the Cell. Rossen Donev (Editor), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Cilt 107, s. 37-76): Academic Press. 2017; 37-76.
- Ulloa, L. ve Messmer, D. (2006). High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev*; 17(3), 189-201. doi:10.1016/j.cytogfr.2006.01.003
- Vagsholm, I., Nesse, L. L. ve Gudding, R. (1991). Economic analysis of vaccination applied to ovine listeriosis. *Vet Rec*; 128(8), 183-185. doi:10.1136/vr.128.8.183
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., Kreft, J. (2001). Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews*; 14(3), 584-640. doi:10.1128/CMR.14.3.584-640.2001
- Vela, A. I., Fernandez-Garayzabal, J. F., Latre, M. V., Rodriguez, A. A., Dominguez, L. ve Moreno, M. A. (2001). Antimicrobial susceptibility of Listeria monocytogenes isolated from meningoencephalitis in sheep. *Int J Antimicrob Agents*; 17(3), 215-220. doi:10.1016/s0924-8579(00)00318-6
- Venereau, E., De Leo, F., Mezzapelle, R., Careccia, G., Musco, G. ve Bianchi, M. E. (2016). HMGB1 as biomarker and drug target. *Pharmacol Res*; 111, 534-544. doi:10.1016/j.phrs.2016.06.031
- Vénéreau, E., Leo, F., Mezzapelle, R., Careccia, G., Musco, G. ve Bianchi, M. (2016). HMGB1 as biomarker and drug target. *Pharmacological Research*; 111. doi:10.1016/j.phrs.2016.06.031
- Virna, S., Deckert, M., Lütjen, S., Soltek, S., Foulds, K. E., Shen, H., Schlüter, D. (2006). TNF Is Important for Pathogen Control and Limits Brain Damage in Murine Cerebral Listeriosis. *The Journal of Immunology*; 177(6), 3972. doi:10.4049/jimmunol.177.6.3972
- Volmari, A., Foelsch, K., Yan, K., Qi, M., Bartels, K., Kondratowicz, S., Boettcher, M., Nishibori, M., Liu, K., Schwabe, R., Lohse, A., Huber, S., Mittrüecker, H., Huebener, P., (2019). Leukocyte-derived High-mobility group box 1 controls innate immune responses against Listeria monocytogenes. *bioRxiv* doi: 10.1101/797902
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J. M., Ombrellino, M., Che, J., Tracey, K. J. (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*; 285(5425), 248-251. doi:10.1126/science.285.5425.248
- Wang, Y., Jiang, Z., Yan, J. ve Ying, S. (2019). HMGB1 as a Potential Biomarker and Therapeutic Target for Malignant Mesothelioma. *Dis Markers*; 2019, 4183157. doi:10.1155/2019/4183157
- Wang, J., Wu, C., Wang, Y., Chen, C., Cheng, J., Rao, X., & Sun, H. (2020). The role of HMGB1 in invasive Candida albicans infection. *bioRxiv* 2020.01.21.914895; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.01.21.914895>
- Webster, K. M., Shultz, S. R., Ozturk, E., Dill, L. K., Sun, M., Casillas-Espinosa, P., & Semple, B. D. (2019). Targeting high-mobility group box protein 1 (HMGB1) in pediatric traumatic brain injury: Chronic neuroinflammatory, behavioral, and epileptogenic consequences. *Experimental neurology*, 320, 112979.
- Webster, K. M., Sun, M., Crack, P. J., O'Brien, T. J., Shultz, S. R., & Semple, B. D. (2019). Age-dependent release of high-mobility group box protein-1 and cellular neuroinflammation after traumatic brain injury in mice. *Journal of Comparative Neurology*, 527(6), 1102-1117.
- Weinberg E. D. (1984). Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. *Reviews of infectious diseases*, 6(6), 814–831. <https://doi.org/10.1093/clinids/6.6.814>

- Wilesmith, J. W. ve Gitter, M. (1986). Epidemiology of ovine listeriosis in Great Britain. *Vet Rec*; 119(19), 467-470. doi:10.1136/vr.119.19.467
- Winter, P., Schilcher, F., Bago, Z., Schoder, D., Egerbacher, M., Baumgartner, W. ve Wagner, M. (2004). Clinical and histopathological aspects of naturally occurring mastitis caused by *Listeria monocytogenes* in cattle and ewes. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*; 51(4), 176-179. doi:10.1111/j.1439-0450.2004.00751.x
- Xu, Y. ve Eissa, N. T. (2010). Autophagy in innate and adaptive immunity. *Proceedings of the American Thoracic Society*; 7(1), 22-28. doi:10.1513/pats.200909-103JS
- Yanai, H., Matsuda, A., An, J., Koshiba, R., Nishio, J., Negishi, H., Taniguchi, T. (2013). Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 110(51), 20699-20704. doi:10.1073/pnas.1320808110
- Yang, D., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J., & Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *The Journal of experimental medicine*, 192(7), 1069–1074. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1069>
- Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D. M., Lubkowski, J. ve Oppenheim, J. J. (2004). Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol*; 22, 181-215. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104603
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Oppenheim, J. J. (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*; 286(5439), 525-528. doi:10.1126/science.286.5439.525
- Yang, D., de la Rosa, G., Tewary, P. ve Oppenheim, J. J. (2009). Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends in immunology*; 30(11), 531-537. doi:10.1016/j.it.2009.07.004
- Yang, D. ve Oppenheim, J. J. (2004). Antimicrobial proteins act as "alarmins" in joint immune defense. *Arthritis Rheum*; 50(11), 3401-3403. doi:10.1002/art.20604
- Yang, D., Rosenberg, H. F., Chen, Q., Dyer, K. D., Kurosaka, K. ve Oppenheim, J. J. (2003). Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), an antimicrobial protein with chemotactic activities for dendritic cells. *Blood*; 102(9), 3396-3403. doi:10.1182/blood-2003-01-0151
- Yang, D., Tewary, P., de la Rosa, G., Wei, F., & Oppenheim, J. J. (2010). The alarmin functions of high-mobility group proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1799(1-2), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.11.002>
- Yang, H., Hreggvidsdottir, H. S., Palmblad, K., Wang, H., Ochani, M., Li, J., Lu, B., Chavan, S., Rosas-Ballina, M., Al-Abed, Y., Akira, S., Bierhaus, A., Erlandsson-Harris, H., Andersson, U., & Tracey, K. J. (2010). A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11942–11947. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003893107>
- Yu, Y., Tang, D. ve Kang, R. (2015). Oxidative stress-mediated HMGB1 biology. *Front Physiol*; 6, 93. doi:10.3389/fphys.2015.00093
- Zayed, H., Izsvak, Z., Khare, D., Heinemann, U. ve Ivics, Z. (2003). The DNA-bending protein HMGB1 is a cellular cofactor of Sleeping Beauty transposition. *Nucleic Acids Res*; 31(9), 2313-2322. doi:10.1093/nar/gkg341

- Zelenik, K., Avberšek, J., Pate, M., Lušicky, M., Krt, B., Ocepek, M. ve Zdovc, (2014). I. Cutaneous listeriosis in a veterinarian with the evidence of zoonotic transmission--a case report. *Zoonoses Public Health*; 61(4), 238-241. doi:10.1111/zph.12075.
- Zenewicz, L. A. ve Shen, H. (2007). Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. *Microbes and infection*; 9(10), 1208-1215. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.008
- Zhang, J., Klufas, D., Manalo, K., Adjepong, K., Davidson, J. O., Wassink, G., Stonestreet, B. S. (2016). HMGB1 Translocation After Ischemia in the Ovine Fetal Brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*; 75(6), 527-538. doi:10.1093/jnen/nlw030

ÖZ GEÇMİŞ

Fotoğraf

Neslihan Akbulut Tosun, Torbalı Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'ni bitirdikten sonra Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2009 yılında mezun oldu. 2014 yılında OMÜ LEE Doktora programına girdi. 2011'den bu yana Tarım ve Orman Bakanlığı'nda Veteriner Hekim olarak görev yapmaktadır. Orta derecede İngilizce bilmektedir.

İletişim Bilgileri

E mail*: neslihan.akbulut@tarimorman.gov.tr

ORCID ID: 0000-0002-9365-1798

Akbulut, N., Hiçyılmaz, Z., Dönmez, A., Us, M., 2014. 2000-2014 Yılları Arasında Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Patoloji Laboratuvarında Rastlanan Ruminant Hastalıkları: Restrospektif Bir Çalışma. *VII. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), KARS.*

Akbulut, N., Er, H., Dönmez, A., Us, M., 2014. Karadeniz Bölgesinde Hayvan Kuduzunun Epidemiyolojisi. *VII. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), KARS.*

Akbulut, N., Kadı, H., 2015. Demonstration of BVDV antigen on ear skin notchs of the persistently infected cattle with BVDV. *Poster presentation.*

Katıldığı Eğitim, Kongre ve Sempozyumlar:

Uluslararası Katılımlı Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi, 2014
32. Dünya Veteriner Hekimliği Kongresi, 2015