



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**LYME OLGULARININ BORRELIA BURGDORFERİ
ANTİJENİ İLE UYARILMIŞ PERİFERİK KAN
MONONÜKLEER HÜCRELERİNDE IFN- γ , IP-10,
I-TAC VE MIG AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

ŞEYDA KARABÖRK

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

KASIM 2021



**LYME OLGULARININ *BORRELIA BURGDORFERI* ANTİJENİ İLE
UYARILMIŞ PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRELERİNDE IFN- γ ,
IP-10, I-TAC VE MIG AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şeyda KARABÖRK

**DOKTORA TEZİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım

bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Şeyda KARABÖRK

11.11. 2021

LYME OLGULARININ *BORRELIA BURGDORFERI* ANTİJENİ İLE UYARILMIŞ
PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRELERİNDE IFN- γ , IP-10, I-TAC VE MIG
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)

Şeyda KARABÖRK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Kasım 2021

ÖZET

Bu çalışmada amacımız Lyme hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerini (PBMC) *Borrelia burgdorferi*'ye spesifik rekombinant dış yüzey proteini (rOspC) ile uyararak, uyarımdan 24, 48 ve 72 saat sonra toplanan süpernatant örneklerinde IFN- γ , MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11 düzeylerinin değerlendirilmesi ve erken tanıya destek olabilecek bir belirteç belirleyebilmektir. Çalışmaya 13 Eritema kronikum migrans (ECM), 7 Lyme artriti (LA), 10 Lyme nöroborelyoz (LNB) ve 10 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 40 birey dahil edilmiştir. Olguların ve kontrollerin mononükleer hücreleri ayrıştırılarak kültüre edilmiştir. Kültüre edilen PBMC'ler rOspC ile uyarılarak 24, 48 ve 72 saat sonra toplanan kültür süpernatantlarında IFN- γ MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 düzeyleri ELİSA ile ölçülmüştür. Olguların ve kontrol grubunun rOspC ile uyarımı sonrası ilk 24 saatte ECM ve LNB olgularında IP-10/CXCL10 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (sırasıyla $p=0,013$, $p=0,016$). LA olgularında ise kontrol grubu ile karşılaştırma yapıldığında ilk 24 saatte hem MIG/CXCL9 hem de IP-10/CXCL10 düzeylerinde 48 ve 72. saate kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (sırasıyla $p=0,008$, $p=0,007$). Kene teması olan veya olmayan Lyme borelyoz şüpheli olgularda özellikle endemik bölgelerde seronegatiflik olsa bile western blot ile doğrulama yapılması önerilmektedir. Lyme hastalarının PBMC'lerinden izolasyon yapılarak IFN- γ ilişkili kemokinler üzerinde yapılan çalışmamız hastalığın hem tanısı için potansiyel yeni belirteçlerin belirlenmesi hem de hastalığın patogenezinin detaylı olarak incelenmesi için belirli veriler elde etmemize olanak sağlamıştır. Çalışmamızın verilerine göre serolojik testlere ek olarak hastalığın her üç klinik tutulum biçiminde de kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren IP-10/CXCL10'un erken dönemde tanıda kullanılabilecek potansiyel bir belirteç olabileceği düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 1039.2
Anahtar Kelimeler : Lyme Hastalığı, rOspC, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11
Sayfa Adedi : 125
Danışman : Prof. Dr. Resul KARAKUŞ

INVESTIGATION OF IFN- γ , IP-10, I-TAC AND MIG ACTIVITY IN *BORRELIA*
BURGDORFERI ANTIGEN STIMULATED PERIPHERAL BLOOD
MONONUCLEAR CELLS OF LYME CASES

(Ph. D. Thesis)

Şeyda KARABÖRK

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

November 2021

ABSTRACT

In this study, we aimed to determine a marker that can support an early diagnosis by evaluating IFN- γ , MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, and I-TAC/CXCL11 levels by stimulate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of Lyme patients and *Borrelia burgdorferi*-specific recombinant outer surface protein (rOspC) in the supernatant samples collected 24, 48, and 72 hours after stimulation. A total of 40 individuals, including 13 Erythema chronicum migrans (ECM), 7 Lyme arthritis (LA), 10 Lyme neuroborreliosis (LNB), and 10 healthy controls, were included in the study. Mononuclear cells of cases and controls were separated and cultured. The cultured PBMCs were stimulated with rOspC, and ELISA measured IFN- γ , MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 levels in the culture supernatants collected after 24, 48, and 72 hours. A statistically significant difference was found in the IP-10/CXCL10 level in ECM and LNB cases in the first 24 hours after stimulation with rOspC in the subjects and control group ($p=0.013$, $p=0.016$, respectively). In LA cases, when compared with the control group, a statistically significant difference was found in both MIG/CXCL9 and IP-10/CXCL10 levels in the first 24 hours compared to the 48th and 72nd hours ($p=0.008$, $p=0.007$, respectively). It is recommended to confirm with WB in cases with suspected Lyme borreliosis with or without tick contact, especially in endemic areas, even if there is seronegativity. Our study on IFN- γ related chemokines by isolating from PBMCs of Lyme patients has enabled us to obtain specific data for both determining potential new markers for the diagnosis of the disease and for detailed examination of the pathogenesis of the disease. According to the data of our study, in addition to serological tests, IP-10/CXCL10, which shows a significant increase in all three forms of clinical involvement of the disease compared to the control group should considered as a potential marker that can be used in early diagnosis.

Science Code : 1039.2
Key Words : Lyme disease, rOspC, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11
Page Number : 125
Supervisor : Prof. Dr. Resul KARAKUŞ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren, detayların ne kadar önemli olduğunu kavramamı sağlayan danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Resul KARAKUŞ'a, İmmünoloji'nin özel bir alan olduğunu gösteren, inceliğiyle gönüllerimizi fetheden Sayın Prof. Dr. Ayşegül ATA K YÜCEL'e, aldığımız her dersinde ufuk açan yalnızca derslerin değil sosyalliğin ve genel kültürün de akademide önemli olduğunu vurgulayan Hocam Sayın Prof. Dr. Vedat BULUT'a, projemize katılmayı kabul eden ve mikrogliya hattını temin ederek bize destek olan Hocam Sayın Prof. Dr. E. Ümit BAĞRIAÇIK'a, "Lyme hastalığı bir okyanus" seni de bu okyanusa çektim diyen, olgularımızı özenle seçmemize destek olan Hocam Sayın Prof. Dr. Fatma SIRMATEL'e, tek çocuk olduğumu bana hissettirmeyen, hocalığı, bilgisi dışında her zaman ablam gibi hissettiğim, gecenin kaçı olursa olsun, yorgunda olsa bilim denince akan suları durduran, çalışmanın olguları için nörolojik yönden bizi destekleyen canım Hocam Sayın Doç. Dr. Şule AYDIN TÜRKOĞLU'na, gözlerinde immünoloji ışığı gördüm diyerek immünoloji doktorası yapmama vesile olan Hocam Sayın Doç. Dr. İshak Özel TEKİN'e ve yetişmem de emeği olan saygıdeğer tüm hocalarıma, hücre kültürü laboratuvar kullanımı için destek olan Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'na, çalışmada kullandığım monosit hücre hattını paylaşan Dr. Ali ÖZTUNA ve Dr. Meral SARPER'e, immünolojiye gönül vermiş sevgili doktora arkadaşlarıma, çalışmama katılmayı kabul eden tüm gönüllülere, Başımın tacı, fedakârlığın en büyük timsali bir tanecik anneme, desteğini hep hissettiğim tüm aileme, beni her zaman destekleyen, her vazgeçişimde yapabilirsin diyerek yeniden toparlanmamı sağlayan, akademi zor ama farklı dememe rağmen kendisi de akademiden vazgeçmeyen hayat arkadaşım, can yoldaşım, canım eşim Mehmet Akif'e, ders dönemindeyken hayatımıza katılan, varlığıyla ömrüme ömür katan, can parem, kıymetlim, minik kelebeğim kızım Melike Ayça'ya, bu satırları yazarken tekmeleriyle kendisini bana hissettiren, daha doğmadan bilim dünyama katılan oğlum Mehmet Kağan'a,

Sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından 2019/28 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Lyme Hastalığının Tanımı	5
2.2. Lyme Hastalığının Tarihçesi.....	5
2.3. Lyme Hastalığının Epidemiyolojisi.....	6
2.3.1. Kenenin beslenme mekanizması	8
2.3.2. <i>B.burgdorferi</i> taksonomisi/sınıflandırılması	9
2.4. <i>B.burgdorferi</i> Mikrobiyolojik Özellikleri.....	10
2.5. Lyme Hastalığının Patogenezi	12
2.5.1. <i>B.burgdorferi</i> dış yüzey proteinleri ve Lyme hastalığı patogenezi.....	13
2.6. Lyme Hastalığının Kliniği	18
2.7. <i>B.burgdorferi</i> Laboratuvar Tanısı.....	23
2.8. <i>B.burgdorferi</i> 'ye Karşı Korunma ve Tedavi.....	30
2.9. <i>B.burgdorferi</i> 'ye Karşı İmmün Yanıt	32
2.9.1. Doğal (innate) immün yanıt ve çeşitli evazyon mekanizmaları...	34
2.9.2. Adaptif (kazanılmış) immün yanıt.....	40

	Sayfa
2.9.3. Sitokin ve kemokinler	41
3. YÖNTEM	49
3.1. Araç-Gereçler	49
3.1.1. Çalışma grupları.....	49
3.1.2. Kullanılan kitler.....	56
3.1.3. Hücre kültürü malzemeleri	57
3.2. Çalışmanın Aşamaları	59
3.2.1. Örneklerin toplanması.....	59
3.2.2. Alınan örneklerden periferik kan mononükleer hücrelerinin ayrılması ve hücrelerin dondurulma aşaması	59
3.2.3. Çalışma öncesi dondurulan hücrelerin hazırlanma aşaması.....	60
3.2.4. Hücre kültürü ekimi için hücre sayımının yapılması	61
3.2.5. PBMC'lerin kültüre edilmesi, hücrelerin proliferasyonu ve süpernatantların toplanması	61
3.3. Çalışma Planı	62
3.3.1. Hücre kültüründen elde edilen süpernatant örneklerinde sitokin ve kemokinlerin ölçümü.....	63
3.4. İstatistiksel Analiz	66
4. BULGULAR	67
4.1. Lyme Olgu Gruplarında, rOspC ile Uyarım Sonrası Zamana Bağlı Olarak Toplanan PBMC Kültür Süpernatantlarında Sitokinlerin Ölçüm Sonuçları	74
4.2. Lyme Olguları ile Kontrol Grubunun rOspC ile Uyarım Sonrası Zamana Bağlı Olarak Toplanan PBMC Kültür Süpernatantlarında Sitokin Düzeylerinin Karşılaştırılması	76
4.3. Hücre hatlarının rOspC ile Uyarım Sonrası Zamana Bağlı Olarak Toplanan Kültür Süpernatantlarında Sitokin Düzeyleri	80
5. TARTIŞMA	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	97

	Sayfa
KAYNAKLAR.....	99
EKLER.....	119
EK-1. Etik Kurul Onayı.....	120
EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu	121
ÖZGEÇMİŞ	122



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>B.burgdorferi</i> sensu lato genotipleri	6
Çizelge 2.2. Lyme hastalığının klinik belirtileri	22
Çizelge 2.3. Lyme borelyoz için klinik olguların tanımı ve gerekli olan laboratuvar testleri.....	24
Çizelge 2.4. ELİSA ve WB tanı kitlerinde antikorları tespit etmeye yarayan seçili antijenler ve özellikleri	28
Çizelge 2.5. <i>B.burgdorferi</i> 'nin memeli konak ile olan etkileşimi ve sağ kalımı üzerindeki etkisi.....	36
Çizelge 2.6. <i>B.burgdorferi</i> 'nin immün yanıttan kaçış mekanizması.....	37
Çizelge 3.1. Çalışmamıza dahil edilen olguların ve kontrol grubunun demografik özellikleri.....	49
Çizelge 3.2. Kene temas formu anketi.....	55
Çizelge 3.3. Çalışma sırasında kullanılan test kitleri.....	56
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan cihazlar	57
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	58
Çizelge 3.6. Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar	58
Çizelge 3.7. Olguların (ECM/LA/LNB) 24 kuyucuklu plak şeması	62
Çizelge 4.1. Lyme hastalarına (n=30) ait demografik veriler, kene öyküsü ve mononükleer canlı hücre (PBMC) sayıları.....	67
Çizelge 4.2. Olguların pikniğe gitme sıklığı ve seyahat öykülerine ait veriler....	68
Çizelge 4.3. Sağlıklı kontrollere ait demografik veriler, mL'deki canlı PBMC sayıları.....	68
Çizelge 4.4. ECM olgularının ELİSA, WB test sonuçları ve seçili klinik özellikleri	70
Çizelge 4.5. LA olgularının ELİSA, WB test sonuçları ve seçili klinik özellikleri	70
Çizelge 4.6. LNB olgularının ELİSA, WB test sonuçları ve seçili klinik özellikleri	71

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.7. ECM olgularının rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri	74
Çizelge 4.8. LA olgularının rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri	74
Çizelge 4.9. LNB olgularının rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri	75
Çizelge 4.10. ECM olguları ve kontrol grubunun rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri.....	76
Çizelge 4.11. LA olguları ve kontrol grubunun rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri.....	76
Çizelge 4.12. LNB olguları ve kontrol grubunun rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri.....	77
Çizelge 4.13. Mikroglia ve monosit hücre hatları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası zamana bağlı olarak toplanan kültür süpernatantlarında MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeylerinin karşılaştırılması	81

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>B.burgdorferi</i> 'nin enzootik döngüsü.....	8
Şekil 2.2. Nimf, larva, yetişkin erkek ve dişi keneler	8
Şekil 2.3. Spiroketlerin taksonomisi	9
Şekil 2.4. <i>B.burgdorferi</i> 'nin morfolojisi ve hücresel yapısı.....	10
Şekil 2.5. <i>B.burgdorferi</i> B31'in sistematik şeması	11
Şekil 2.6. <i>B.burgdorferi</i> genom haritası	11
Şekil 2.7. <i>Borrelia</i> 'nın yaşam döngüsünde öne çıkan proteinler	13
Şekil 2.8. <i>Ixodes</i> keneleri aracılığı ile enfekte olan konaklarda <i>B.burgdorferi</i> enfeksiyonu ve protein etkileşiminde OspC'nin önemi.....	15
Şekil 2.9. Kene ısırması sonrası görülen ECM görüntüleri	19
Şekil 2.10. Lyme hastalığının klinik belirtileri	22
Şekil 2.11. CDC kriterlerine göre Lyme seroloji takibi.....	26
Şekil 2.12. ELİSA yöntemi	27
Şekil 2.13. Lyme borelyoz gelişiminde önemli olan kene-konak-patojen etkileşimleri	35
Şekil 2.14. Kemirgen konaklarında <i>B.burgdorferi</i> 'nin kalıcılığına katkıda bulunan faktörler	35
Şekil 2.15. Doğal bağışıklık yanıtının kene tükürüğü ile inhibisyonu.....	37
Şekil 2.16. İmmün yanıtta MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11 ekseninin önemi	46
Şekil 3.1. Çalışmaya dahil edilen gruplar.....	49
Şekil 3.2. Periferik kandan mononükleer hücre (PBMC) eldesi	60
Şekil 3.3. Otomatize hücre sayım prosedürü.....	61
Şekil 3.4. ELİSA standart dilüsyon hazırlığı	64
Şekil 3.5. ELİSA standart dilüsyon hazırlığı	65
Şekil 3.6. ELİSA standart dilüsyon hazırlığı	65

Şekil	Sayfa
Şekil 3.7. ELİSA standart dilüsyon hazırlığı	66
Şekil 4.1. Lyme olguları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında MIG/CXCL9'un zamana bağlı değişimi	78
Şekil 4.2. Lyme olguları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında IP-10/CXCL10'un zamana bağlı değişimi	79
Şekil 4.3. Lyme olguları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında I-TAC/CXCL11'in zamana bağlı değişimi	80
Şekil 4.4. Hücre hatları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında MIG/CXCL9'un zamana bağlı değişimi	81
Şekil 4.5. Hücre hatları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında P-10/CXCL10'un zamana bağlı değişimi	82
Şekil 4.6. Hücre hatları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında I-TAC/CXCL11'in zamana bağlı değişimi	82

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Kene ısırması sonrası olgulardan görüntü (Diz eklem bölgesi)	19
Resim 2.2. Kene ısırması sonrası olgulardan görüntü (Bel bölgesi)	20
Resim 2.3. Kene ısırması sonrası olgulardan görüntü (Diz bölgesi)	20
Resim 2.4. Lyme tedavisi sırasındaki ECM görüntüsü	21
Resim 3.1. ECM/LA/LNB grubu plak şeması	62
Resim 4.1. Olgulara ait <i>B.burgdorferi</i> WB IgG bant pozitiflikleri	72
Resim 4.2. Olgulara ait <i>B.burgdorferi</i> WB IgG bant pozitiflikleri ve WB IgM bant negatiflikleri	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Derece Celsius
µl	Mikrolitre
cm ²	Santimetrekare
CO ₂	Karbondioksit
g	Gram
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pg	Pikogram
pM	Pikomolar
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions per minute)
β	Beta
α	Alfa
γ	Gama
δ	Delta
κ	Kappa

Kısaltmalar	Açıklamalar
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACA	Akrodermatit Kronika Atrofikans (Acrodermatitis Chronica Atrophicans)
ARG	Arginin (Arginine)
ASH	Antijen Sunan Hücre (Antigen Presenting Cell)

Kısaltmalar	Açıklamalar
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
B31	<i>B.burgdorferi</i> B31
BBA57	<i>B.burgdorferi</i> Virulans Faktör 57 (<i>B.burgdorferi</i> Virulence Factor 57)
BBA64	<i>B.burgdorferi</i> surface-localized lipoprotein 64
BBK32	Fibronektin bağlayıcı protein 32 (Fibronectin-binding protein 32)
BL	Borrelial Lenfositoma (Borrelial Lymphocytoma)
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BP	Baz Çifti (Base Pair)
BPTA	Borrelial Persistence in Ticks A
BSK	Barbour-Stoenner-Kelly Besiyeri
C	Sitozin (Cytosine)
CCL	C-C Tipi Kemokin Ligand (C-C Type Chemokine Ligand)
CD	Farklılaşma Kümesi (Cluster of Differentiation)
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers For Disease Control and Prevention)
CRASP	Complement-Regulator Acquiring Surface Protein
CSF	Koloni Uyarıcı Faktör (Colony Stimulating Factor)
CSPA	Complement Surface Protein A
CXCL	C-X-C Tipi Kemokin Ligand (C-X-C Type Chemokine Ligand)
CXCL10	Kemokin Ligand 10 (Chemokine Ligand 10)
CXCL11	Kemokin Ligand 11 (Chemokine Ligand 11)
CXCL9	Kemokin Ligand 9 (Chemokine Ligand 9)
CXCR3	Kemokin Reseptör 3 (Chemokine Receptor 3)
CXCR4	Kemokin Reseptör 4 (Chemokine Receptor 4)
CXCR7	Kemokin Reseptör 7 (Chemokine Receptor 7)
DBPA	Dekörin Bağlayıcı Protein A (Decorin Binding Protein A)
DBPB	Dekörin Bağlayıcı Protein B (Decorin Binding Protein B)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit (Dimethyl sulfoxide)
ECM	Eritema Kronikum Migrans (Erythema Chronicum Migrans)

Kısaltmalar	Açıklamalar
ELİSA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Assay (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ERP	OspEF ilişkili Protein (OspEF-Related Proteins)
FBS	Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi (Food Drug Administration)
FITC	Floresein İzotiyosiyanat (Fluorescein Isothiocyanate)
FLA	Flagellin
G	Guanin (Guanine)
GLU	Glutamik Asit (Glutamic Acid)
HIV	İnsan İmmünyetmezlik Virüsü (Human Immunodeficiency Virus)
HMC3	İnsan Mikroglia Hücre Hattı (Human Microglia Cell Line)
HRP	Horse Radish Peroksidaz
ICAM-1	İntrasellüler Adezyon Molekülü 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)
IDSA	Amerika Bulaşıcı Hastalıklar Derneği (Infectious Diseases Society of America)
IFA	İndirekt Floresan Testi (Indirect Immunofluorescence Assay)
IFN	İnterferon
IFN-β	İnterferon Beta
IFN-α	İnterferon Alfa
IFN-γ	İnterferon Gama
IgG	İmmünglobulin G
IgM	İmmünglobulin M
IL	İnterlökin
IL-1	İnterlökin-1
IL-10	İnterlökin-10
IL-12	İnterlökin-12
IL-1β	İnterlökin-1 Beta
IL-2	İnterlökin-2
IL-28	İnterlökin-28
IL-29	İnterlökin-29
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8

Kısaltmalar	Açıklamalar
IP-10	Interferon gamma-induced protein 10
I-TAC	Interferon–Inducible T Cell Alpha Chemoattractant
LA	Lyme Artrit (Lyme Arthritis)
LEU	Lösın (Leucine)
LNB	Lyme Nöroborelyoz (Lyme Neuroborreliosis)
LP25	Linear Plasmid 25
LP38	Linear Plasmid 38
LPS	Lipopolisakkarit
MAC	Membran Atak Kompleks (Membrane Attack Complex)
MHC	Majör Doku Uygunluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)
MIG	Monokine Induced by IFN- γ
MRNA	Mesajcı RNA (Messenger RNA)
MS	Multipl Skleroz
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
Nf-κB	Nükleer Faktör Kappa B (Nuclear Factor Kappa B)
NK	Doğal Öldürücü Hücre (Natural Killer Cell)
OD	Optik Yoğunluk (Optic Density)
OMS	Dış Zarı Kapsayan Porin (Outer Membrane-Spanning Protein)
ORF	Açık Okuma Çerçevesi (Open Reading Frame)
OSPA	Dış Yüzey Proteini A (Outer Surface Protein A)
OSPB	Dış Yüzey Proteini B (Outer Surface Protein B)
OSPC	Dış Yüzey Proteini C (Outer Surface Protein C)
OSPD	Dış Yüzey Proteini D (Outer Surface Protein D)
OSPE	Dış Yüzey Proteini E (Outer Surface Protein E)
OSPF	Dış Yüzey Proteini F (Outer Surface Protein F)
P100	Protein 100
P17	Protein 17
P18	Protein 18
P35	Protein 35
P39	Protein 39
P41	Protein 41
P58	Protein 58
P66	Protein 66

Kısaltmalar	Açıklamalar
P83	Protein 83
PBMC	Periferik Kan Mononükleer Hücre (Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PBS	Fosfat Tamponlu Solüsyon (Phosphate Buffer Solution)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RAW 264.7	Fare Makrofaj Hücresi (Murine Macrophage Cell)
ROSPC	Rekombinant Dış Yüzey Proteini C (Recombinant Outer Surface Protein C)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
RRNA	Ribosomal RNA
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction)
SALP15	Tükürük Proteini 15 (Salivary Protein 15)
SDF-1	Stromal Hücre Türevi Faktör 1 (Stromal Cell-Derived Factor 1)
SF	Serum Fizyolojik
TBE	Kene Kaynaklı Ensefalit (Tick Borne Encephalitis)
TGF	Tümör Büyüme Faktörü (Tumor Growth Factor)
TH	Yardımcı T Hücre (T Helper Cell)
THP-1	İnsan Monosit Hücre Hattı (Human Monocyte Cell Line)
TLR	Toll Benzeri Reseptör (Toll-Like Receptor)
TNF	Tümör Nekroz Faktör (Tumor Necrosis Factor)
TPHA	<i>Treponema pallidum</i> Hemaglutinasyon
U-937	İnsan Monosit Hücre Hattı (Human Monocyte Cell Line)
VDRL	Veneral Disease Research Laboratory
VLSE	Değişken Yüzey Lipoproteini E (Variable Surface Lipoprotein E)
VMP	Değişken Ana Protein (Variable Major Protein)
WB	Western Blot
γδT	Gama-Delta T Hücre/Lenfosit

1. GİRİŞ

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar Lyme hastalığı, Sifiliz ve Leptospiroz gibi spiroket enfeksiyonlarının insidansında artış olduğunu göstermiştir. Spiroketler halk sağlığı açısından büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Ancak spiroketlerin neden olduğu hastalıkların mekanizması/immünpatogenezi henüz aydınlatılmamıştır (Christodoulides, Boyadjian ve Kelesidis, 2017). “Spiroket enfeksiyonlarında bu derece güçlü bir immün yanıtı hangi hücresel bileşen ve/veya bileşenler tetiklemektedir?” sorusuna son yıllarda yapılan transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi omik teknolojileri ile yanıtlar aranmaktadır. Hatta bu teknolojilerin önemli bir avantajının hem tanı da hem de tedavide hastalıklar için önemli bir yeri olacağı belirtilmektedir (Badawi, 2017). Spiroketlerin membranları konağın immün sistemi ile etkileşime girmede çok önemli bir rol oynarlar. Lyme hastalığı, *Borrelia* cinsi bakterilerin neden olduğu, oldukça yaygın olan vektör kaynaklı bulaşıcı bir hastalık, persistan/kalıcı global bir halk sağlığı sorunudur (Shapiro, 2014). Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Avrupa ve Asya’da *Borrelia* enfeksiyonu ve Lyme hastalığı ile ilgili, mesleki maruziyet oldukça sık bildirilmiştir.

Lyme hastalığı belirtileri/semptomları cilt, kardiyak, eklem ve sinir tutulumu olarak görülür. Ancak klinikte “Erythema chronicum migrans” (Eritema kronikum migrans) (ECM), “Lyme arthritis” (Lyme artrit) (LA) ve “Lyme neuroborreliosis” (Lyme nöroborelyoz) (LNB) olarak daha sık görülmektedir. Lyme hastalığını yapan bakteri *Borrelia burgdorferi* (*B.burgdorferi*) sensu lato, tipik olarak insanlar da dahil olmak üzere memeli konaklarına iksodid (sert gövdeli) keneler tarafından iletilir (Acari: Ixodidae) (Dersch ve Rauer, 2017; Halsey, Allan ve Miller, 2018). İnsanlarda *B.burgdorferi*’nin *B.burgdorferi* sensu lato kompleksinde yer alan *B.burgdorferi* sensu stricto (Kuzey Amerika), *B.garinii* ve *B.afzelii* (Avrupa ve Asya) genotiplerinin oluşturduğu hastalık Lyme borelyozu olarak tanımlanmaktadır (Plusa, 2017).

Lipopolisakkaritler (LPS) gibi bakteriyel komponentler bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu inflamasyonu tetiklemekte önemli rol almaktadırlar. LPS gibi bir komponenti taşınamalarına rağmen *B.burgdorferi* gibi spiroketler agresif bir immün yanıt göstermektedirler. *B.burgdorferi* türleri 100’den fazla lipoprotein eksprese etmektedirler ancak *B.burgdorferi* için öne çıkan lipoproteinlerden biri “Outer surface

protein A" (Dış yüzey proteini A (OspA) olarak bilinen yüzey proteini'dir. Lipoproteinlerin immün sistemi aktive etme veya inhibe etmedeki rolleri önemlidir (Kenedy, Lenhart ve Akins, 2012). Spiroket lipoproteinlerinin düzenleyici mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasının spiroket enfeksiyonlarından kaynaklanan klinik sonuçlara dair de bilgi sağlayabileceği vurgulanmaktadır (Kenedy ve diğerleri, 2012; Steere ve diğerleri, 2016). Bilindiği gibi nötrofiller akut bakteriyel enfeksiyonların immünpatogenezinde majör bir role sahip, mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattını oluşturan hücrelerdir. *B.burgdorferi* nötrofiller tarafından fagosit edilir. Ancak "Outer surface protein B" (Dış yüzey proteini B) (OspB) gibi spiroketal lipoproteinler nötrofillerin bu fonksiyonunu inhibe ederek konakta uzun süreli enfeksiyon oluşmasına neden olurlar (Yang, Pal, Alani, Fikrig ve Norgard, 2004). Nötrofillerin haricinde monosit/makrofajlar da spiroketlerin immünopatogenezinde önemli bir yere sahiptir. Spiroketal lipoproteinler monosit/makrofajların membranındaki "Cluster of differentiation 14" (Farklılaşma kümesi 14) (CD14) aracılığıyla monositik hücreleri aktive ederek etkileşime girerler. Bu etkileşim transkripsiyon faktörü olan "Nuclear factor kappa B" (Nükleer faktör kappa B) (Nf- κ B) yolağını aktive eder ve pro-inflamatuar yanıtı indükler (Christodoulides ve diğerleri, 2017; Kelesidis, 2014; Yang ve diğerleri, 2004). Ayrıca spiroketal lipoproteinlerin pro-inflamatuar etkisi "Toll like receptors" (Toll benzeri reseptörler) (TLR) aracılığı ile meydana gelir. TLR sinyali sitokin üretimini artırır bu da pro-inflamatuar yanıtı indükler. OspA ve OspB'nin immün yanıt ile ilgili bu özelliklerinin yanısıra *B.burgdorferi* makrofajlar tarafından meydana gelen fagositozu inhibe eden "Outer surface protein C" (Dış yüzey proteini C) (OspC) de içermektedir (Charon ve diğerleri, 2012). Hastalığın kliniğine bakıldığında erken dönem (Klinik dönem I), erken yaygın dönem (Klinik dönem II) ve geç yaygın dönem (Klinik dönem III) tanımlamaları yapılmaktadır. Klinik dönem I ve II kene ısırmasını takiben birkaç gün içerisinde veya birkaç haftaya kadar ortaya çıkarken klinik dönem III hastalığın başlangıcından aylar hatta yıllar sonra kendisini gösterebilmektedir (Cardenas-de la Garza, De la Cruz-Valadez, Ocampo-Candiani ve Welsh, 2019). Bu gibi durumlarda Lyme hastalığında erken tanı konulmadığı ve hastalık tedavi edilmediğinde hastalığın klinik seyri ikinci ve üçüncü klinik dönemlere kadar ilerlemektedir. Birçok hastalığı taklit edebilmesi ve ECM dışında tipik bir bulgusu olmaması nedeniyle Lyme tanısında güçlükler yaşanmaktadır. Tanıda "Centers for Disease Control and Prevention" (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi) (CDC)

kriterlerine göre öncelikle “Enzyme linked immunosorbent assay” (Enzim bağılı immunosorbent assay) (ELİSA) veya “Indirect fluorescent antibody” (İndirekt floresan antikor) (IFA) testleri ile *B.burgdorferi*’ye karşı oluşan antikorlar tespit edilir. Bu testlerin sonucunda herhangi bir pozitiflik veya şüpheli bir durum saptandığında ise Lyme tanısında “Gold standard” (Altın standart) olarak bilinen Western blot (WB) testi ile doğrulama yapılmaktadır. Ancak hastalığın ilk dönemlerinde ELİSA ile teşhiste güçlükler yaşanmaktadır (Borchers, Keen, Huntley ve Gershwin, 2015; Miraglia, 2016; Schutzer ve diğerleri, 2018). Serolojik testlerin standardizasyonunun çok iyi olmaması değerlendirme yaparken dikkat edilmesi gereken bir husustur. Erken tanıda, “Recombinant outer surface protein C” (Rekombinant dış yüzey protein C) (rOspC)’nin kullanıldığı testlerin, ELİSA testlerine göre daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Schutzer ve diğerleri, 2018). Makrofajlar tarafından yapılan fagositozu inhibe etmesi OspC’yi Lyme hastalığı için önemli bir virulans faktörü yapmıştır ve OspC kene ısırmasından çok kısa bir süre sonra oluşmaktadır (Carrasco ve diğerleri, 2015). Tanıda yaşanan güçlükler ve Lyme tanılı hastaların fazla olması bu konu üzerinde özellikle durulması gerektiğini göstermektedir. Lyme hastalığının tanısının hızlıca yapılabilmesi için immün yanıtta rol alan sitokin, kemokin gibi mediyatörlerin hastalık ile bağlantısının araştırılması önem taşımaktadır.

İnflamasyonda ve enfeksiyonlara karşı konak cevabında lökositlerin dokulara yerleşimi önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Bu süreç kemokinler tarafından kontrol edilmektedir (Cerar ve diğerleri, 2013; Ramesh ve diğerleri, 2015). Kemokinler yaklaşık 8-12 kilo dalton (kDa) boyutunda lökositleri inflamasyon bölgesine çekerek inflamatuvar yanıtı düzenleyen küçük kemotaktik sitokinlerdir (Ramesh, MacLean ve Philipp, 2013; Fallahi, Elia ve Bonatti, 2017). *Borrelia* enfeksiyonunun olduğu yere lökositlerin göç etmesinde, inflamatuvar ve immün yanıtta rol alan sistematik isimlendirmede “Monokine induced by gamma interferon” (MIG/CXCL9), “Interferon-gamma inducible protein 10” (IP-10/CXCL10) ve “Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant” (I-TAC/CXCL11) Lyme immünolojisinde yer almış önemli mediyatörlerdir. Bu kemokinlerden IP-10/CXCL10 inflamasyonun düzenlenmesinde rol alabilen, ilk kez çeşitli hücrelerde “Interferon gamma” (İnterferon gama) (IFN- γ) tedavisinden sonra indüklenen bir erken yanıt geni olarak tanımlanan polipeptittir ve salınması IFN- γ ’ya bağlıdır. Her üç

kemokininin de IFN- γ dışındaki ortak özellikleri bağlandıkları reseptörün “Chemokine receptor 3” (Kemokin reseptör 3) (CXCR3) olmasıdır (Müllegger ve diğerleri, 2007).

Literatürde ECM’de IFN- γ , MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11 seviyelerinin yüksek olduğu gösterilmiş ancak daha ileri çalışmalar yapılması gerektiği kanısına varılmıştır (Müllegger ve diğerleri, 2007).

Bu çalışmada Enfeksiyon Hastalıkları ve Nöroloji kliniklerinde Lyme tanısı almış hastaların sitokin ve kemokin profillerini araştırabilmek için hastalardan elde edilen periferik kan örneklerinden izole edilen monositlerin kültürü yapılarak, bu kültürlerin rOspC ile uyarımının ardından 24, 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra IFN- γ , MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11 düzeylerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle Lyme hastaları görülme sıklıkları dikkate alınarak üç gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu olarak da çalışmaya asemptomatik sağlıklı bireyler (Lyme hastası olmadığı serolojik ve klinik bulgularla değerlendirilerek) dahil edilmiştir. İmmünpatogeneze açısından Lyme hasta grupları kendi aralarında ve kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bugüne kadar Lyme hastalığı ile ilgili pek çok çalışma yapılmış, ancak ülkemiz genelinde Lyme hastalığının üç farklı tutulumunun (ECM, LA ve LNB) bir arada olduğu ve monosit kültürleri üzerine bir çalışmadan elde edilen herhangi bir veri ortaya konulmamıştır. Bu çalışmadan elde edilecek veriler sayesinde hastalığın üç farklı tutulumu (ECM, LA ve LNB) bütüncül bir yaklaşımla incelenecek ve gelecekte hızlı tanı ve tedaviye yönelik güncel araştırmalara ışık tutulabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lyme Hastalığının Tanımı

Lyme hastalığı insanlara geyik kenesi olarak bilinen keneler aracılığıyla taşınan *B.burgdorferi* sensu lato kompleksi içerisinde yer alan spiroketlerin neden olduğu, birçok farklı sistemi tutabilen, geç komplikasyonları ile kronik hale gelebilen inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın ilk belirtileri kene ısırması sonrası grip benzeri semptomlar ve eklem ağrıları ile kendisini gösteren kırmızı, içten dışa dairesel olarak genişleyen döküntülerin varlığının gözlenmesidir (Borchers ve diğerleri, 2015; Steere ve diğerleri, 2016).

2.2. Lyme Hastalığının Tarihçesi

Lyme hastalığının geçmişine bakıldığında 1883’lerde Alman Hekim Alfred Buchwald’ın dermatolojik belirti ve/veya deri döküntüsü olarak adlandırdığı, 1902’de Karl Herxheimer ve Kuno Hartman’ın “Acrodermatitis chronica atrophicans” (Akrodermatit kronika atrofikans) (ACA) olarak tanımladığı döküntüler incelendiğinde hastalığın oldukça eski yıllara dayandığı görülmektedir (Burgdorfer, 1993). Daha sonraki dönemlerde İsveçli dermatolog Arvid Afzelius tarafından 1909 yılında *Ixodes ricinus* (*I.ricinus*) türü bir kene tarafından ısırılan bir olguda oluşan dairesel lezyon ECM olarak isimlendirilmiştir (Elbaum-Garfinkle, 2011; Hellerstrom, 1951).

Fransız hekimler Garin ve Bujadoux 1922 yılında kene tarafından ısırılan bir çiftçiye kene ısırmasından üç hafta sonra sol kalçası üzerindeki kızarıklık ve ağrılı radikülit nedeniyle spiroket enfeksiyonu olarak rapor etmişlerdir (Halperin, 2018b). İsveçli Sven Hellerström 1930 yılında ECM bulgusundan üç ay sonra bir hastada meningoensefalit olduğunu ve bunun da geyik keneleri olarak da bilinen *Ixodes* cinsi keneler ile ilgili olduğunu tanımlamıştır (Dumic ve Severnini, 2018). İlerleyen yıllarda ECM ve sinir sistemi arasında bir ilişki olduğu saptanmış ve ECM olgularının deri biyopsilerinde ilk kez spiroketler tespit edilmiştir. İkinci Dünya Savaşı sonrası etkin olarak kullanılmaya başlanan Penisilin, Hollström tarafından ECM olgularının tedavisinde kullanılmıştır (Halperin, 2018b; Johnson, Schmid, Hyde, Steigerwalt ve Brenner, 1984).

Steere ve diğerleri Connecticut eyaletinde Old Lyme olarak bilinen küçük bir kasabada 1975 yılında bir grup çocukta dizlerde oluşan şişliklerle giden yeni bir artrit çeşidi tanımlamışlardır ve bu artrit “Lyme artrit” (LA) ismini vermişlerdir (Steere ve diğerleri, 1977; Steere ve diğerleri, 2016). İlk 51 LA vakasının 1977’de tanımlanmasından sonra 1982 yılında Willy Burgdorfer tarafından Lyme hastalığına neden olan *B.burgdorferi* isimli bakteri keşfedilmiştir (Halperin, 2018b). Bakterinin keşfinden sonra 1984 yılında tanı için serolojik testler ilk kez Connecticut kasabasında kullanılmaya başlanmıştır. Bundan tam üç yıl sonra Lyme hastalığı raporlanabilen bir hastalık haline gelerek kısa sürede hastalık ile ilgili vakalar bildirilmeye ve ulusal alanda yayılmaya başlamıştır. Hastalığa karşı ilk aşı 1997 yılında kullanıma sunulmasına rağmen, 2002 yılında aşı ile ilgili çalışmalar sonlandırılmıştır (Barbour ve Benach, 2019).

2.3. Lyme Hastalığının Epidemiyolojisi

Lyme hastalığı, spiroket bir mikroorganizma olan *B.burgdorferi* sensu lato kompleksine ait birkaç farklı genotipin neden olduğu kene kaynaklı bir zoonozdur. *I.ricinus* türü kenelerin kemirgenler ve kuşlar arasındaki döngüsü ile insanlara bulaşmaktadır. Epidemiyolojik veriler incelendiğinde Lyme hastalığı artık hem Avrupa hem de Kuzey Amerika’da en sık görülen vektör kaynaklı hastalık olarak kabul edilmektedir. CDC tarafından bildirilen 2018 verileri her yıl 30 000 vakanın rapor edildiğini gerçekte ise 300 000’den fazla vaka olduğunu bildirmektedir (Halperin, 2018b; Mead, Petersen ve Hinckley, 2019). Kenelerin kendisinden veya enfekte ettikleri küçük omurgalı canlılardan elde edilen izolatlarda en az 18 farklı *B.burgdorferi* sensu lato genotipi tarif edilmiştir (Çizelge 2.1) (Mead, 2015).

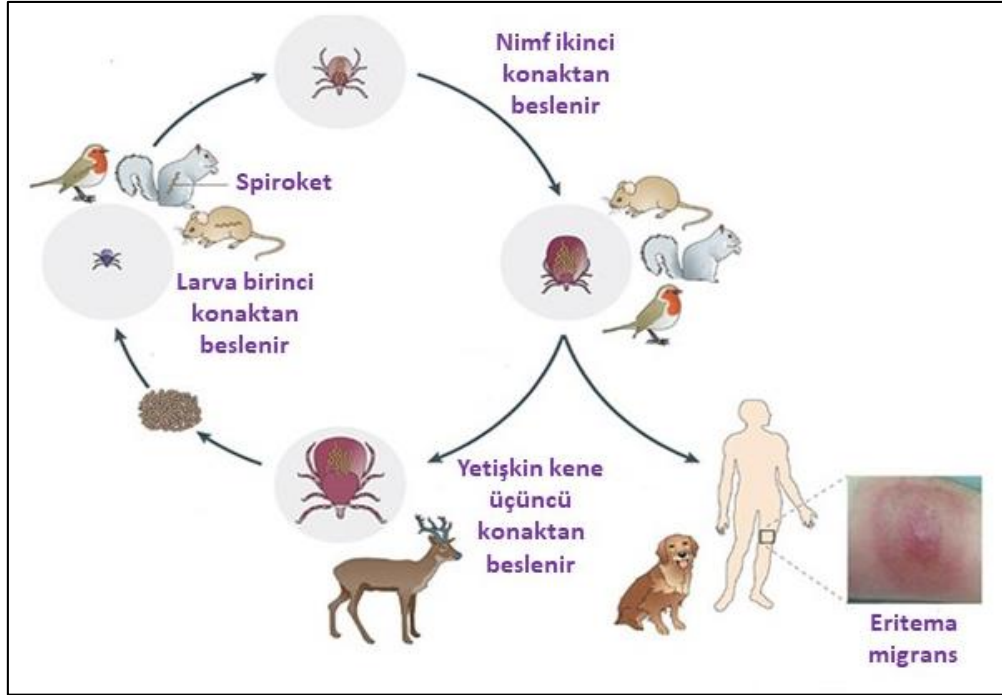
Çizelge 2.1. *B.burgdorferi* sensu lato genotipleri

Kuzey Amerika	Avrupa	Asya
<i>B.americana</i>	<i>B.afzelii*</i>	<i>B.afzelii*</i>
<i>B.andersonii</i>	<i>B.bavariensis</i>	<i>B.bissettii</i>
<i>B.bissettii</i>	<i>B.bissettii</i>	<i>B.garinii</i>
<i>B.burgdorferi</i>	<i>B.burgdorferi*</i>	<i>B.japonica</i>
<i>B.californiensis</i>	<i>B.garinii*</i>	<i>B.sinica</i>
<i>B.carolinensis</i>	<i>B.lusitaniae</i>	<i>B.tanukii</i>
<i>B.kurtenbachii</i>	<i>B.spielmanii</i>	<i>B.turdii</i>
-	<i>B.valaisiana</i>	<i>B.valaisiana</i>
-	-	<i>B.yangtze</i>

*: İnsanlarda yerleşik patojenler

İnsanlarda en çok enfeksiyona neden olan 3 alt tür ise *B.afzelii*, *B.garinii* ve *B.burgdorferi* sensu stricto olarak bilinmektedir. *B.burgdorferi* ismi tüm kompleksi ifade etmek için kullanılmaktadır. Bunlar arasında yalnızca *B.burgdorferi*'nin Kuzey Amerika'da Lyme hastalığına neden olduğu söylenmektedir (Steere ve diğerleri, 2016). İnsanlardan izole edilen *B.spielmannii*, *B.bavariensis*, *B.valaisiana*, *B.lusitaniae* ve *B.bissetii* gibi alt türlerde vardır ancak bu türlerin halk sağlığı açısından ne derece önemli oldukları halen araştırılmaktadır (Auwaerter, 2015; Halperin, 2018b). Ülkemiz ele alındığında ise Türkiye'de *B.burgdorferi*, 1998 yılında Karadeniz bölgesindeki sığırlardan toplanan *I.ricinus* türü kenelerden izole edilmiştir (Polat, Çalışır, Yücel ve Tüzer, 1998). *Testudo graeca* adı verilen kaplumbağaların üzerinde yaşayan *Hyalomma aegyptium* türündeki kenelerden de Borreliaların izole edilmesinin ardından 2007 yılında bir köpekte klinik bir Lyme vakası gözlenmiş ve Türkiye'deki köpeklerde ve atlarda *B.burgdorferi* antikorları tespit edilmiştir (Bakirci, 2016; Guner ve diğerleri, 2004). "Türkiye'de Lyme Hastalığı" başlıklı bir derlemede 1995-2017 yılları arasında Lyme hastalığı prevalansı ile ilgili yapılan tezler, olgu sunumları ele alınmış bu hastalığın Türk toplumundaki duyarlılığının da giderek artmakta olduğuna dikkat çekilmiştir (Öncel, 2018). Dünyada ve Ülkemizde yapılan çalışmalar da ele alındığında Lyme hastalığı prevalansı coğrafi bölgelere ve mevsimlere göre oldukça farklılık göstermektedir. Ülkemizde genel olarak Mart-Eylül aylarında (İlkbahar-Yaz mevsimi) hastalık pik yapmaktadır. Lyme seroprevalansı üzerine yapılan çalışmalarda net olmamakla birlikte ülkemizdeki sıklık %2-44 arasında değişiklik göstermektedir (Öncel, 2018).

B.burgdorferi'nin neden olduğu enfeksiyonlar zoonoz enfeksiyonlar olarak bilinmektedir. Mikroorganizma ile enfekte keneler fare gibi kemiricilere, kuşlara ve geyik gibi hayvanlara tutunabilmektedir. Göç eden kuşlar bakteri ile enfekte olmuş kenelerin dağılımında büyük bir role sahiptir. Kenelerin yaşam siklusu ve hayatı Şekil 2.1'de görülmektedir (Tilly, Rosa ve Stewart, 2008).



Şekil 2.1. *B. burgdorferi*'nin enzootik döngüsü (Tilly, Rosa ve Stewart, 2008)

2.3.1. Kenenin beslenme mekanizması

B. burgdorferi ile enfekte keneden insanlara hastalığın bulaşabilmesi için kene ile temas ve/veya ısırılmanın olması gerekmektedir. Kliniklere gelen hastaların birçoğu kene ile temas ettiğini ve/veya ısırıldığını keneler nimf boyutunda ise fark etmemektedir. Nimf kenelerin boyut olarak küçük olması beslenme sonrasında kendiliklerinden düştükleri için de gözden kaçabilmektedir. *Ixodes* cinsi kenelerin yaşam döngülerinde üç beslenme aşaması vardır ve her birinde mutlaka kan ile beslenirler. Beslenebilmeleri için larva, nimf ve yetişkin keneler ön bacakları ile tutunabilecekleri hayvan arayışına girmektedirler (Şekil 2.2) (Paules, Marston, Bloom ve Fauci, 2018).

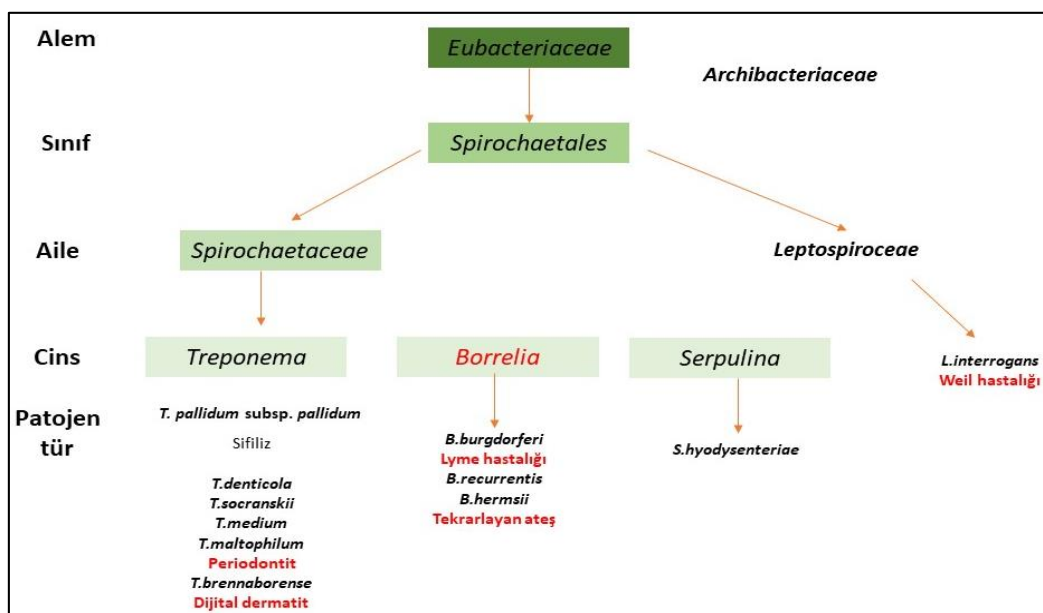


Şekil 2.2. Nimf, larva, yetişkin erkek ve dişi keneler (Paules, Marston, Bloom ve Fauci, 2018)

Tutunacakları konağın genellikle baş bölgesi, kulak ve boyun bölgesi veya kasık bölgelerine ulaşırlar (Cook, 2015; Richter, Matuschka, Spielman ve Mahadevan, 2013). Bu tutunmalarının ardından keneler, konağa histamin ve sitokin inhibitörleri ve antikoagülanlar olmak üzere birçok kompleks biyoaktif karışımları da enjekte ederler. Kenenin salgıladığı bu mediyatörler sayesinde ağrısız bir “ısırık” meydana gelmiş olur (Goodman, Dennis ve Sonenshine, 2005; Nuttall ve Labuda, 2008). Sertour ve diğerlerinin (2018) yapmış oldukları deneysel bir çalışmada bakterinin enfeksiyon kinetiği incelenmiş ve bu çalışmanın sonucunda spiroketin bulaşması için kenenin 24 saat vücutta kalması gerektiği gösterilse de özellikle nimf keneler için bu etkinin 12 saat içerisinde de görülebildiği belirtilmiştir.

2.3.2. *B.burgdorferi* taksonomisi/sınıflandırılması

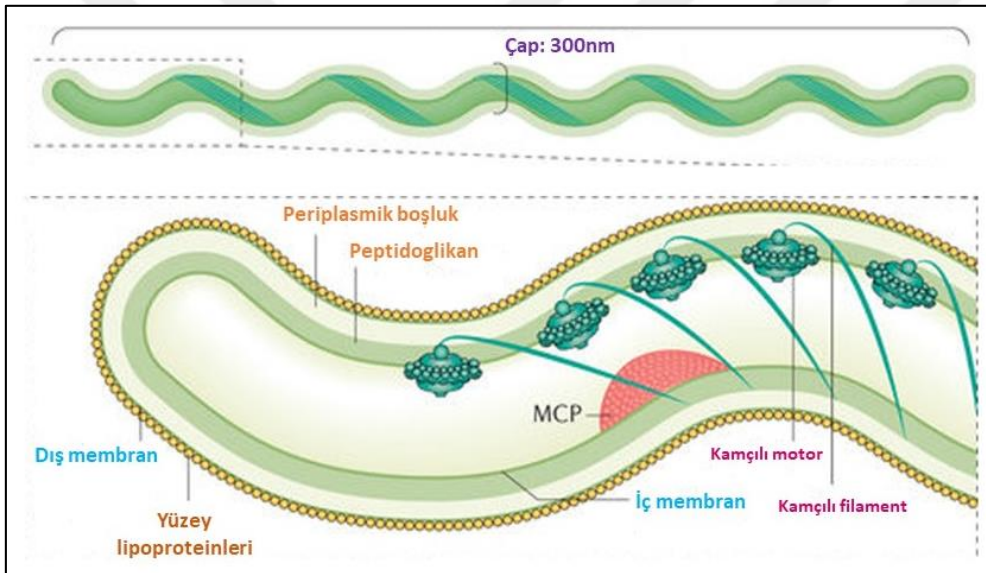
Spiroketler, benzeri olmayan bir hücre duvar yapısına sahip Spirochetales sınıfı ve Spirochaetaceae familyasına ait küçük spiral şekilli bakterilerdir. İnsan için patojen olan Treponema, Leptospira ve Borrelia cinsini içermektedirler. Bunların tümü insan için patojendir (Murray, Rosenthal ve Pfaller, 2015). Şu ana kadar tespit edilen Borrelia türlerinden 13 tanesi kene kaynaklı Lyme hastalığına neden olabilmektedir (Pritt ve diğerleri, 2016). Klinik öneme sahip Spiroketlerin taksonomisi Şekil 2.3'te gösterilmiştir (Schröder, Eckert, Stübs ve Schumann, 2008).



Şekil 2.3. Spiroketlerin taksonomisi (Schröder, Eckert, Stübs ve Schumann, 2008)

2.4. *B.burgdorferi* Mikrobiyolojik Özellikleri

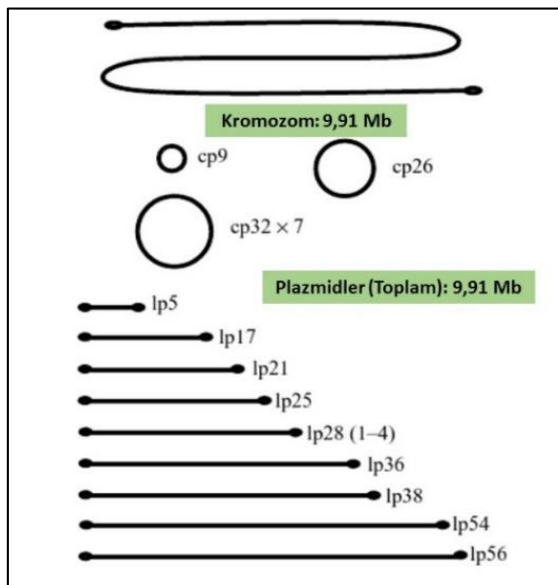
B.burgdorferi 0.2-0.5 μm eninde, 3-20 μm boyunda diğer spiroketlerle karşılaştırıldığında daha büyük, periplazmik flagellalı mikraerofil bir mikroorganizmadır. İki lipid zar ile kaplı protoplazmik bir silindirden oluşan hücre zarfına sahiptir (Gray, Kahl, Lane ve Stanek, 2002; Kudryashev, Cyrklaff, Wallich, Baumeister ve Frischknecht, 2010). Periplazmik silindir yapısı ve flagellasının olması spiroket olan bakterinin hem şeklini sınırlayabilmesine hem de burgu hareketi yaparak kıvrılmasına ve yer değişikliği yapabilmesine imkân vermektedir (Şekil 2.4) (Steere ve diğerleri, 2016).



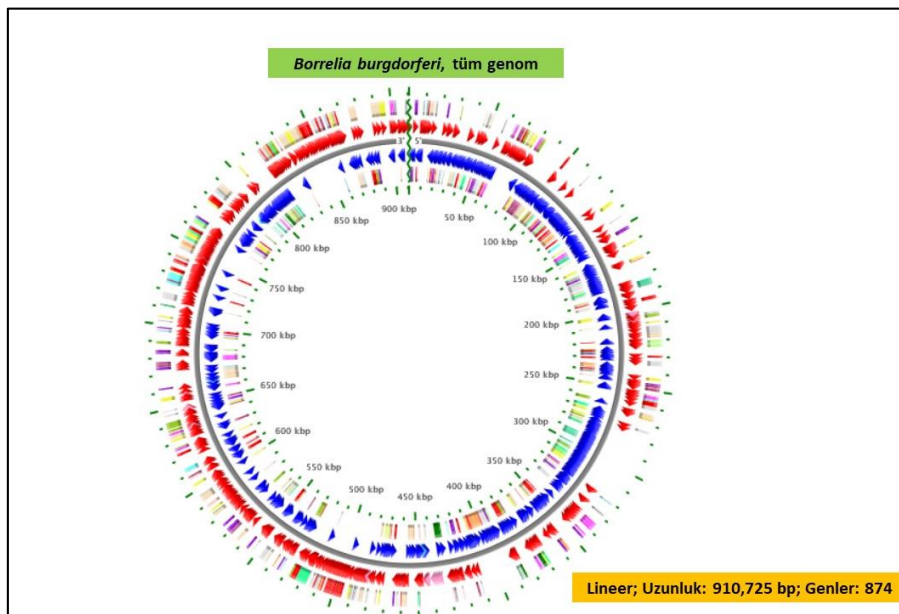
Şekil 2.4. *B.burgdorferi*'nin morfolojisi ve hücresel yapısı (Steere ve diğerleri, 2016)

Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) besiyeri içerisinde 30-35°C'de mikraerofil olarak üreme gösterirler. Gram boyama ile zayıf görünen mikroorganizmanın canlı bakteri sayımı için faz kontrast ve karanlık alan mikroskopları tercih edilmektedir. Işık mikroskopisinin kullanılacağı durumlarda Giemsa, Wright boyası gibi anilin boyalar veya gümüş boyası, floresan mikroskop için ise akridin oranj adı verilen boyanın kullanıldığı boyama yöntemleri kullanılmaktadır (Murray ve diğerleri, 2015). *B.burgdorferi*'nin hücre zarfında farklı bir bileşen dikkat çekmektedir. Gram-negatif bakteriler için önemli bir yere sahip olan LPS, *B.burgdorferi*'de bulunmamaktadır (Takayama, Rothenberg ve Barbour, 1987) bunun yerine bakteri immünoreaktif özellikte glikolipidlere sahiptir (Ben-Menachem, Kubler-Kielb, Coxon, Yergey ve Schneerson, 2003).

B. burgdorferi, genomu tam olarak dizilenen ilk spirokettir (Fraser ve diğerleri, 1997). *B. burgdorferi* sensu stricto B31 türünün genom boyutu 1.521.419 “base pairs” (baz çifti) (bp) olarak bulunmuştur. Bu genom, %28.6 oranla “Guanine” (Guanin) (G) ve “Cytosine” (Sitozin) (C) içeriğine sahip 910.725 bp'lik doğrusal bir kromozom ve boyutu 610.694 bp olan 21 plazmidten (10 dairesel ve 12 doğrusal olmak üzere) oluşmaktadır (Casjens ve diğerleri, 2000; Fraser ve diğerleri, 1997). Yeni dizilenen genomlarının, ortalama 1.314.223 bp/genom olmak üzere toplam 17.084.900 bp içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6) (Schutzer ve diğerleri, 2011).



Şekil 2.5. *B. burgdorferi* B31'in sistematik şeması (Schutzer ve diğerleri, 2011)



Şekil 2.6. *B. burgdorferi* genom haritası (Schutzer ve diğerleri, 2011)

2.5. Lyme Hastalığının Patogenezi

Sifiliz, Lyme hastalığı ve Leptospiroz'a neden olan spiroketler halk sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Steere ve diğerleri, 2016). Her ne kadar epidemiyolojik veriler spiroket enfeksiyonlarının insidansında artış olduğunu gösterse de bu hastalıkların immünpatogenezi hala belirsizliğini korumaktadır (Control ve Prevention, 2007; Madison-Antenucci, Kramer, Gebhardt ve Kauffman, 2020). Spiroketler, konak ile aralarındaki etkileşimi sağlayan lipoproteinleri eksprese ederler. Eksprese edilen bu lipoproteinler immün yanıtı kontrol ederek spiroketlerin bağışıklık sisteminden kaçmasına neden olmaktadır (Christodoulides ve diğerleri, 2017). Spiroket enfeksiyonu sonrasında dokuda oluşan inflamasyon ile gelişen bağışıklık yanıtına rağmen spiroketlerin sahip oldukları "Outer surface proteins" (Dış yüzey proteinleri) (Osp)'lerin antijenik varyasyon göstermeleri bakterinin immün sistemden kaçarak konakta kalmasına neden olmaktadır (Carrasco ve diğerleri, 2015).

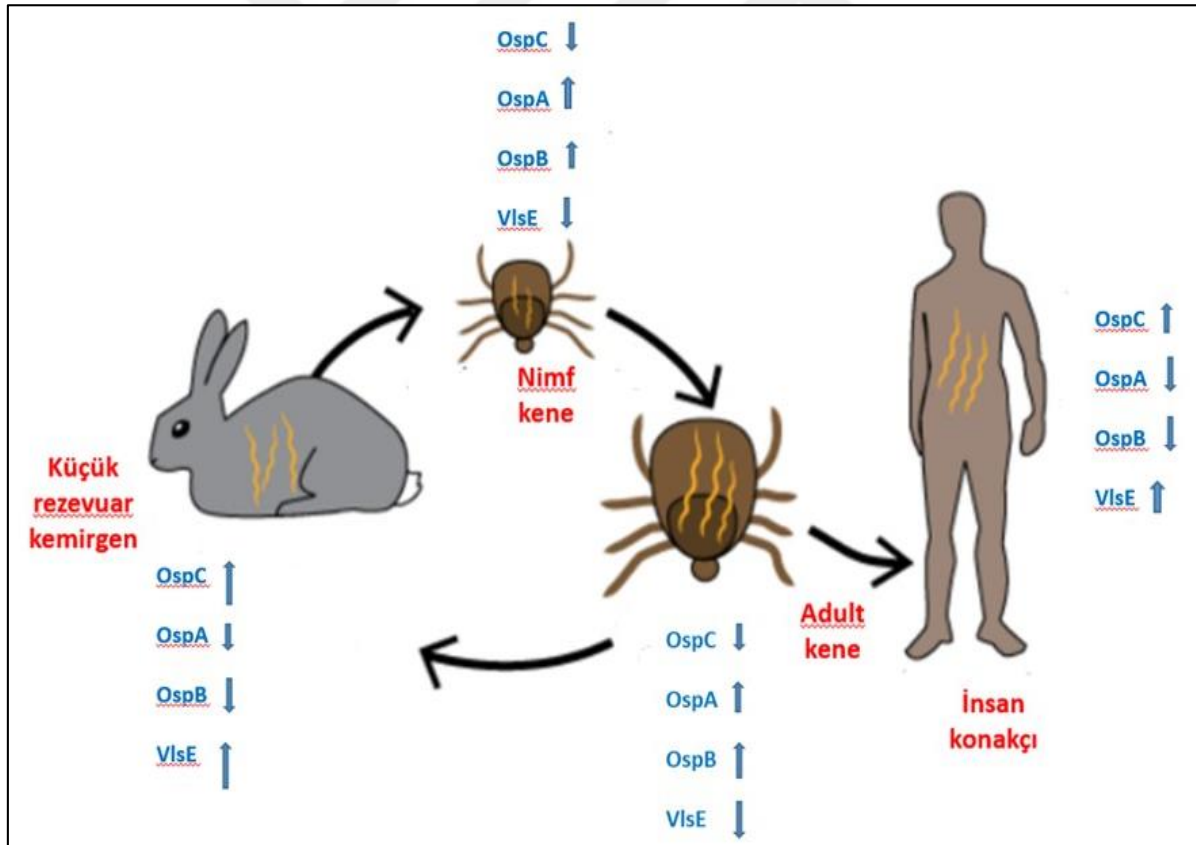
Bakteriyel enfeksiyonlarda inflamasyonun tetiklenmesinde önemli bir role sahip olan LPS'ler gibi bakteriyel bileşenlerin *B.burgdorferi*'deki eksikliğine rağmen oldukça agresif bir immün yanıtın görülmesi bu mikroorganizmayı ilginç hale getirmektedir (Bernard ve diğerleri, 2019). *B.burgdorferi* türleri için yaklaşık 125 lipoprotein geni bilinse de bunlar arasındaki bilinen en önemlileri Osp'lerdir. Plazmid ile kodlanan ve A'dan F'ye isimlendirilen Osp'lerin, bakterinin farklı konaklara adapte olmasına ve hayatta kalmasına yardım ettiği düşünülmektedir (Steere ve diğerleri, 2016). Osp'lere (Örn: OspA) karşı oluşan antikorların insanları ve hayvanları *Borrelia* enfeksiyonundan koruduğu bilinmektedir. Bilinen bu korumanın ardından yapılan araştırmada Lyme hastalığına karşı güvenli ve etkili bir aşı geliştirme çalışması Fikrig ve diğerleri (1992) tarafından geliştirilmiştir. *B.burgdorferi*'nin ekstraselüler bir mikroorganizma olması (Craig-Mylius, Weber, Coburn ve Glickstein, 2005), immün yanıtta hüморal bağışıklığın *Borrelia* için koruyucu rolünün bilinmesi (Liang, Brown, Wang, Lozzo ve Fikrig, 2004) gibi özellikleri dikkate alındığında aşı çalışmalarında,

1. "Surface-exposed" (yüzeye maruz kalan)
2. *Borrelia*'nın farklı suşları ve genotipleri arasında korunan spiroketler ve

3. Kene iletimi ve memeli enfeksiyonu sırasında üretilenler gibi temel ihtiyaçları karşılayabilen herhangi bir Osp'nin aşı çalışmaları için ideal aday olabileceği düşünülmektedir (Kenedy ve diğerleri, 2012).

2.5.1. *B.burgdorferi* dış yüzey proteinleri ve Lyme hastalığı patogenezi

B.burgdorferi'nin enzootik yaşam döngüsü oldukça karmaşıktır ve bakteri *Ixodes* cinsi keneler ve özellikle kemirgenler gibi hayvanlar arasında geçişini sağlamaktadır. Kenenin beslenmesi esnasında orta bağırsak (mid-gut) ve tükürük bezleri aracılığı ile enfekte edeceği memeli dokusuna geçerken bakterinin antijenik yapısında değişiklikler meydana gelmektedir (Halperin, 2018b; Steere ve diğerleri, 2016). *Borrelia*'nın yaşam döngüsünde meydana gelen bu antijenik değişiklik/öne çıkan protein yoğunluğu Şekil 2.7'de gösterilmiştir (Connolly ve Benach, 2005).



Şekil 2.7. *Borrelia*'nın yaşam döngüsünde öne çıkan proteinler (Connolly ve Benach, 2005)

Kenenin beslenmesi esnasında ortaya çıkan OspA (azalan) ve OspC'nin (artan) bu döngüdeki karşılıklı ekspresyonu ilk kez Schwan ve diğerleri (1995) tarafından

raporlanmıştır. Patogenezde önemli rol oynayan Osp'ler lipid ile modifiye edilmiş ve bu proteinleri dış membrana bağlayan bir veya birden fazla transmembran alana sahip Osp'ler olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır (Kenedy ve diğerleri, 2012).

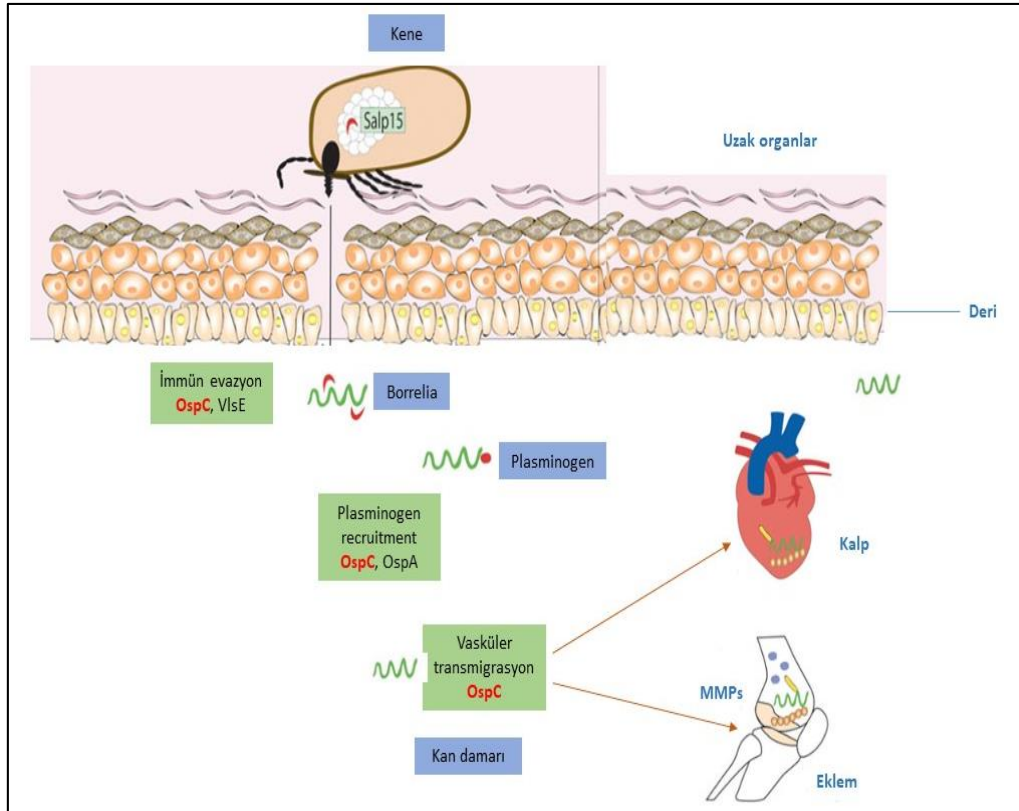
B.burgdorferi'ye ait dış yüzey proteinlerinin özellikleri

OspA ve OspB

Kenelerin orta bağırsaklarındaki bakteri kolonileşmesi sayesinde membranda ilk kez bulunan ve antijenik özelliklerine göre tanımlanan lipoproteinlerdir. Lyme hastalığına yakalanan olgulardan izole edilen spiroketlerde OspA'ya yönelik antikorların reaktif olduğu gözlemlenmiştir (Battisti ve diğerleri, 2008). OspA ve OspB, sırasıyla 31 kDa ve 34 kDa'lık lipoproteinlerdir. Her iki lipoprotein sekansal ve yapısal benzerlik göstermektedir. OspA'nın kenelerdeki spiroketleri kazanılmış/adaptif bağışıklıktan koruduğu, OspB'nin ise bakterinin kenelere bağlanmasında ve hayatta kalmasında kritik rol oynadığı düşünülmektedir (Battisti ve diğerleri, 2008; Neelakanta ve diğerleri, 2007).

OspC

B.burgdorferi'nin değişken bir özellik gösteren yüzey proteini OspC, bakterinin kene aracılığı ile memeli konağa geçişinde önemli bir rol oynamaktadır. OspC, kene beslenmeye başladığı sırada kenenin tükürüğüne yapışarak kenenin ağızına geçmekte ve konağa doğru göç ederek artış göstermektedir. OspC artarken çevrenin sıcaklığı ve "Power of Hydrogen" (pH) değişimi ile OspA ve OspB proteinleri de azalmaktadır (Grimm ve diğerleri, 2004). OspC, kenenin tükürük bezinde yer alan "Salivary protein 15" (Tükürük proteini 15) (Salp15) adı verilen protein ile etkileşime girerek, patojenin bağışıklık yanıtından kaçmasına neden olmaktadır. Bu nedenle OspC Lyme hastalığı patogenezinde oldukça büyük bir öneme sahip ve *Borrelia* tanısı için kullanılan proteinlerden biridir (Şekil 2.8) (Bernard ve diğerleri, 2019; Czubasiewicz, Szewczyk, Wiczowski, Echolc ve Mazur, 2017; Seemanapalli, Xu, McShan ve Liang, 2010).



Şekil 2.8. Ixodes keneleri aracılığı ile enfekte olan konaklarda *B.burgdorferi* enfeksiyonu ve protein etkileşiminde OspC'nin önemi (Bernard ve diğerleri, 2019)

OspD

OspD, Norris ve diğerleri (1992) tarafından *B.burgdorferi* linear plasmid 38 (lp38) üzerinde kodlanan "Outer membrane-spanning protein" (Dış zarı kapsayan porin) (Oms) diye tanımlanan 28 kDa'luk bir lipoproteindir. OspD'nin fonksiyonu araştırıldığında OspA'ya benzer olmasına rağmen kenelerin *Borrelia* tarafından istila edilmesi esnasında bir öneminin olmadığı, spiroketin yaşam döngüsünde sınırlı bir role sahip olduğu belirtilmiştir (Li ve diğerleri, 2007).

OspE

OspE, serum protein faktör diğer adıyla faktör H bağlayıcı olarak tanımlanan 19 kDa'lık ilk yüzey proteini (Hellwage ve diğerleri, 2001; Panelius ve diğerleri, 2008). OspE ekspresyonu kenelerin beslenmesi ve memelilerde oluşan enfeksiyon esnasında artış göstermektedir (Hefty ve diğerleri, 2002). OspE'nin bağlayıcı

aktivitesinin *B.burgdorferi* virulansı ve/veya hastalığın patogenezinde ne gibi bir rol oynayabileceği hala belirsizdir (Kenedy ve diğerleri, 2012).

OspF

OspF, ilk kez *B.burgdorferi* N40 adı verilen alt türde keşfedilmiştir. Fonksiyonu net olarak bilinmese de *B.burgdorferi*'nin hücre adezyonunda rol aldığı düşünülmektedir (Kenedy ve diğerleri, 2012).

BptA

“Borrelial persistence in ticks A” (*BptA*), *B.burgdorferi* linear plasmid 25 (*lp25*) üzerinde kodlanan “Open reading frame” (Açık okuma çerçevesi) (ORF) olan bir lipoproteindir. Kenelerde *B.burgdorferi*'nin kalıcılığına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Revel ve diğerleri, 2005).

Bba64

“*B.burgdorferi* surface-localized lipoprotein 64” (*Bba64*), protein 35 (*p35*) olarak da adlandırılan, linear plasmid 54 (*lp54*) üzerinde bulunan 35 kDa'lık *B.burgdorferi* antijenidir. *Bba64* antikorları, *B.burgdorferi* ile enfekte olmuş farelerden, primatlardan ve Lyme hastalarından alınan serumda tespit edilmiştir (Maruskova, Esteve-Gassent, Sexton ve Seshu, 2008). *Bba64*'ün fonksiyonu hala araştırılmasına rağmen enfekte memelilerde belirli bir role sahip olduğunu, ekspresyonunun ise ancak kenenin beslenmesi esnasında saptanabileceği belirtilmiştir (Brandt ve diğerleri, 2014).

DbpA ve *DbpB*

“Decorin-binding protein A” (*DbpA/p17*) ve “Decorin-binding protein B” (*DbpB/p18*), bağ dokularında bolca bulunan dekorin adı verilen proteoglikana bağlanan sırasıyla 17 kDa ve 18 kDa'lık proteinlerdir. Bu bağlanma aynı zamanda *B.burgdorferi* ile bağ dokusu arasındaki etkileşimi ve hücre adezyonunu sağlamaktadır (Kenedy ve diğerleri, 2012). *DbpA/p17* ve *DbpB/p18*'in, dekorince zengin dokularda enfeksiyonunun kronik formunda kritik bir rol oynadığı, ancak memelilerde

DbpA/p17 ve DbpB/p18'in enfeksiyon oluşturmak için çok da gerekli olmadığı bilinmektedir (Feng ve Wang, 2015).

VlsE

B.burgdorferi'nin hastalığa neden olması memeli konağının enfeksiyonu esnasında bağışıklık yanıtından kaçabilme yeteneğine bağlıdır. *B.burgdorferi*'nin bağışıklık yanıtından kaçışı ile ilgili bilinen yollardan biri, "Variable major protein" (Değişken ana protein) (VMP) benzeri sekans lipoproteini olarak bilinen VlsE (Variable surface lipoprotein E)'nin antijenik varyasyona uğramasıdır. Bakteriyel yüzeyde VlsE dışında çok sayıda proteinin varlığına rağmen VlsE, yüzey epitoplarının sürekli varyasyonunu sergilediği bilinen tek antijen olma özelliğine sahiptir. VlsE'nin bu özelliği *B.burgdorferi*'nin bağışıklıktan kaçmak için VlsE'yi kullandığını, hastalığın kalıcılığı ve virulansı için VlsE'nin gerekli olduğunu düşündürmektedir (Bankhead, 2016).

Fla/p41

"Flagellum-Associated 41" (Fla/p41) olarak bilinen p41, *B.burgdorferi*'de tespit edilen 41 kDa ağırlığında bir proteindir (Wallich ve diğerleri, 1990). Lyme hastalığı için genellikle erken enfeksiyon sırasında spiroketin p41 antijenine karşı İmmünglobulin M (IgM) antikorları geliştirir, ardından p41'e karşı İmmünglobulin G (IgG) antikorları ve çeşitli dış yüzey proteinleri gelişir (Ma, Christen, Leung ve Vigo-Pelfrey, 1992). Ancak p41'in flagellalı olan diğer bakteriler ile çapraz reaksiyon verebildiği bu nedenle *B.burgdorferi* için spesifik olmadığı düşünülmektedir ancak serolojik testlerde yer alan antijenler arasındadır (Zajkowska, 2014).

BmpA/p39

"Basic membrane protein A" (BmpA/p39) *B.burgdorferi* kromozomu üzerinde yer alan bmp genleri tarafından kodlanan ve zar lipoproteinleri olarak spiroketlerin dış zar yüzeyinde yer alan paralog Bmp protein ailesinin bir üyesidir. İnsanlar için oldukça immnojeniktir ve protein 39 (p39) ismiyle Lyme tanısında kullanılan serolojik immünblot tanı kitlerinde kullanılmaktadır (Bryksin ve diğerleri, 2005).

p100/83

B.burgdorferi'nin bir suşundaki protein 100 (p100) adlı proteinini kodlayan p100 geni, ilk *Escherichia coli*'de klonlanmış, sekanslanmış ve eksprese edilmiştir. Protein 83 (p83) ile yüksek bir aminoasit sekans benzerliğine sahip olmaları nedeniyle p83/p100 olarak anılmaktadır (Ditton, Neuss ve Zöller, 1992). *B.afzelii* suşlarına ve izolatlarına karşılık gelen nükleotid sekanslarında yüksek düzeyde homoloji gözlemlenmiştir. *Borrelia* tanısında kullanılan ELİSA ve immünblot kitleri içerisinde p83/p100, p83 veya p100 isimleriyle yer almaktadır. Geç borelyozun temel belirteci olarak ortaya çıkar ve enfeksiyonun geç döneminde stabil kalmaya devam etmektedir (Fomenko ve diğerleri, 2007; Liu ve diğerleri, 2013).

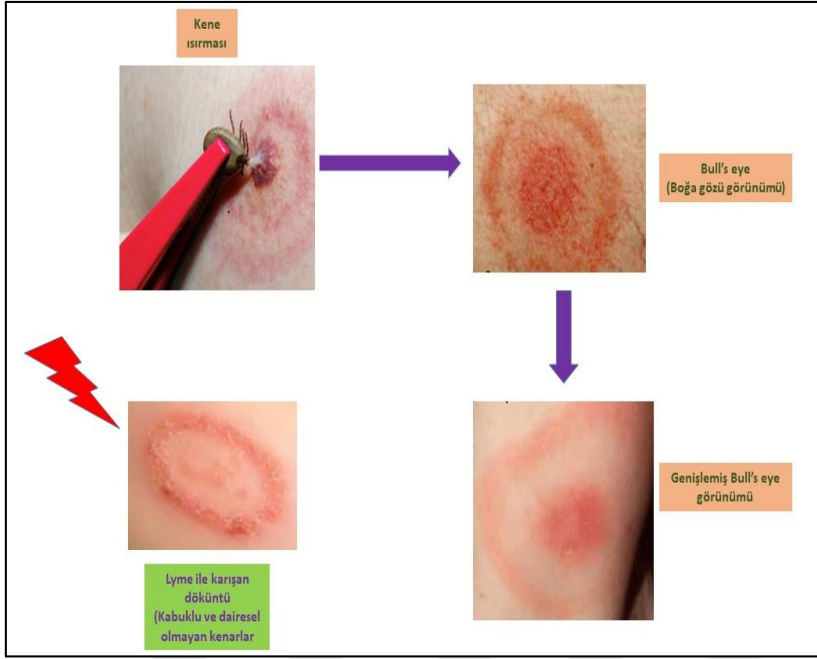
2.6. Lyme Hastalığının Kliniği

Lyme hastalığına neden olan *B.burgdorferi* enfeksiyonunun klinik belirtileri oldukça değişkendir ve birden fazla sistemi etkilemektedir. En sıklıkla etkilenen sistemler deri, eklemler ve sinir sistemi olarak bilinmektedir. Bakterinin konağa deri ile temasından sonra önce bulunduğu bölgeye daha sonra tüm vücuda yayılması söz konusudur (Biesiada, Czepiel, Lesniak, Garlicki ve Mach, 2012).

Klinik belirtiler üç farklı dönem olarak ele alınabilir:

Klinik dönem I

Kene ile temas ve/veya ısırılma sonrasında olguların yaklaşık %80'inde deride oluşan kutanöz lezyonlar gözlenmektedir. Bu lezyonlar ECM, borrelial lenfositoma (BL) ve ACA olarak adlandırılmaktadır. Başlangıçta ECM görülürken daha sonraki dönemde BL, en geç dönemde ise ACA görülmektedir. İlk erken dönemde görülen ECM kenenin ısırmasından sonra gelişebilen ortası soluk kenarları hiperemik ve düz görünümlü genellikle "Dart tahtasına" benzetilen bir görünüme sahiptir (Şekil 2.9) (Steere ve diğerleri, 2016). Hastanın kaşıntı şikâyeti olmayabilir ancak bu ciltteki bu döküntüler yanlışlıkla alerjik reaksiyon olarak değerlendirilebilmektedir (Shapiro, 2014; Steere ve diğerleri, 2016).



Şekil 2.9. Kene ısırması sonrası görülen ECM görüntüleri (Steere ve diğerleri, 2016)



Resim 2.1. Kene ısırması sonrası olgulardan görüntü (Diz eklem bölgesi) (Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD Arşivinden)



Resim 2.2. Kene ısırması sonrası olgulardan görüntü (Bel bölgesi) (Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD Arşivinden)



Resim 2.3. Kene ısırması sonrası olgulardan görüntü (Diz bölgesi) (Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD Arşivinden)



Resim 2.4. Lyme tedavisi sırasındaki ECM görüntüsü (Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD Arşivinden)

Klinik dönem II

Hastalığın bu dönemi erken yaygın enfeksiyon olarak da adlandırılır. Bu dönemde hastaların anamnezlerinde ECM varlığından bahsedilmeyebilir. Isırılmadan haftalar-aylar sonra Bell's palsy adı verilen fasial paralizi, kranial sinir tutulumları gibi nörolojik semptomlar, ani bıçak saplanması tarzında yaygın ağrı, uyuşukluk, karıncalanma, eklem ağrıları gibi gelip geçen ağrılar ve psikolojik sıkıntılar kendisini gösterebilir. Bu dönemde ayrıca geçici artrit, artralji, lenfadenopati, konjunktivit gibi belirtiler görülebilir. Bazen bu semptomlar kendiliğinden geçebildiği gibi tekrarlayarak kronikleşebilmektedir (Hatchette, Davis ve Johnston, 2014).

Klinik dönem III

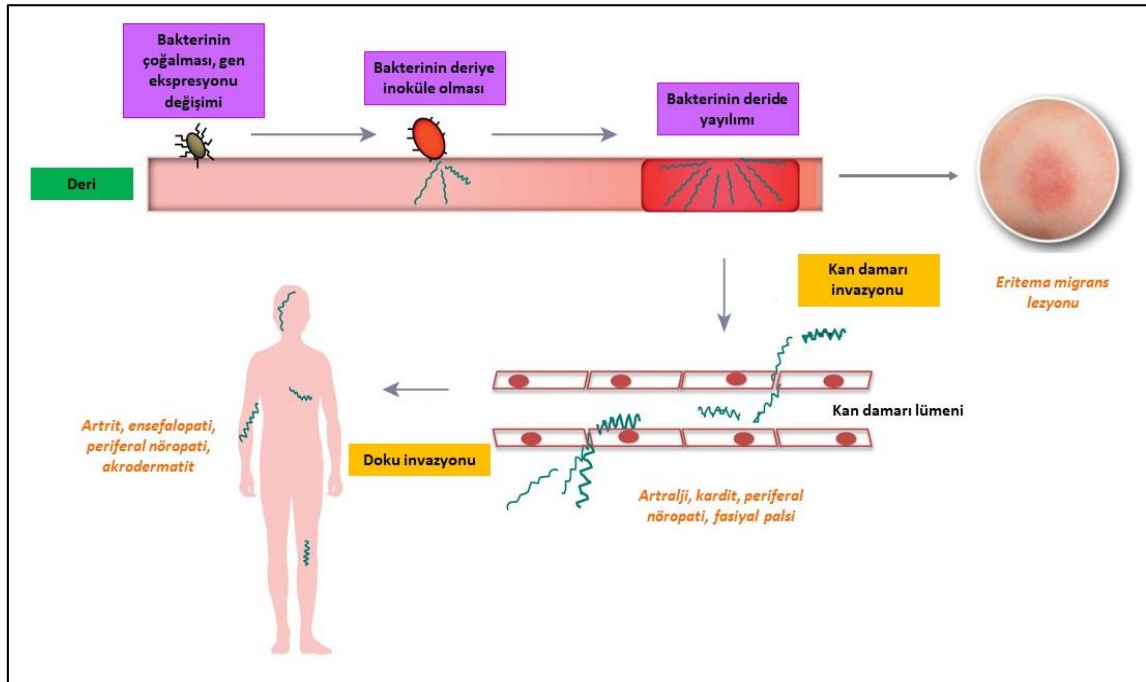
Geç yaygın dönem olarak bilinen bu üçüncü dönemde olgularda diz gibi eklemleri tutan artrit bulguları görülmeye başlanır. Eklemlerde şişlik, eklem ağrıları, eklem tutulumu hatta ödem gözlenebilir (Hatchette ve diğerleri, 2014; Puius ve Kalish, 2008). Bu dönemdeki ensefalopati, polinöropati gibi nörolojik belirtiler aylar hatta yıllar sonra kendisini gösterebilmektedir. Baş ağrısı gibi şikâyetler ile nöroloji polikliniklerine başvuran Multipl skleroz (MS), epilepsi olduğu düşünülen ancak daha sonra detaylı anamnez ve testlerle LNB tanısı alan olgular gözden kaçırılmamalıdır (Sirmatel, Polat ve Türkoglu, 2015). Otoimmün mekanizmaları

tetikleyen durumların da üçüncü dönemin patogeneğinde etkili olduğu düşünülmektedir (Halperin, 2019b).

Lyme hastalığının klinik belirtileri (bütün dönemler) şekil olarak Şekil 2.10'da ve Çizelge 2.2'de gösterilmiştir (Halperin, 2019b; Hatchette ve diğerleri, 2014; Lelovas, Dontas, Bassiakou ve Xanthos, 2008).

Çizelge 2.2. Lyme hastalığının klinik belirtileri

Lyme Hastalığı Semptomları <i>Kene ısırması sonrası</i>			
	Erken lokalize hastalık 2 gün içerisinde	Erken yaygın dönem (<3 ay)	Geç yaygın dönem (>3 ay-yıllar)
<u>Deride:</u>	Bull's eye (Boğa gözü) (ECM) tipinde döküntü	Çoklu ECM	-
<u>Sistemik:</u>	Ateş, baş ağrısı, artralji	Ateş, baş ağrısı, artralji, lenfadenopati	-
<u>Kalp:</u>	-	Atrioventriküler blok, Taşikardi, Miyokardiyal disfonksiyon	-
<u>Beyinde:</u>	-	Aseptik menenjit, kranial nöropati (özellikle fasiyal paralizi), motor veya duyuşal radikülopati	Ensefalopati, aksonal poliradikülonöropati, kronik ensefalomyelit
<u>Kas-İskelet sisteminde:</u>	-	-	Oligoartiküler artrit
<u>Gözde:</u>	-	-	Oküler retinit (nadir)



Şekil 2.10. Lyme hastalığının klinik belirtileri (Halperin, 2019b)

2.7. *B.burgdorferi* Laboratuvar Tanısı

Lyme borelyoz, başta cilt olmak üzere, sinir sistemi, eklemler ve kalp gibi birçok organı etkileyen özellikle kuzey yarımkürede kene kaynaklı en sık görülen hastalıktır (Stanek, Wormser, Gray ve Strle, 2012; Steere ve diğerleri, 2016). Lyme hastalığı klinik belirtilerinin oldukça çeşitli olması tanısını da özel hale getirmektedir. *B.burgdorferi* sensu lato'ya karşı oluşacak antikorlar mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık istenen serolojik testler arasında yer almaktadır. *Borrelia* türlerinin heterojen oluşu tanıda her ülkenin kendi türlerine göre kullanacakları testleri tercih etmeleri gerekliliğini göstermektedir. Örneğin Avrupa'da, Lyme borelyoz *B.burgdorferi* sensu stricto, *B.afzelii* ve *B.garinii* gibi farklı türlerden kaynaklanmaktadır. ABD'de ise Avrupa'ya nazaran *B.burgdorferi* sensu stricto insanları enfekte ettiği bilinen önemli bir türdür (Aguero-Rosenfeld, Wang, Schwartz ve Wormser, 2005). Tanıda öncelikli olarak antikor saptama yöntemleri kullanılırken, mikroorganizmanın kültürde izole edilmesi ve nükleik asit teknikleri gibi moleküler yöntemler ile saptanması klinik ve serolojik olarak belirsiz bulguları netleştirmek için kullanılabilir. Ancak bu yöntemlerdeki sınırlamalar bu tür incelemeler için uzmanlaşmış laboratuvarlara gereksinimi gerektirmektedir (Wilske, Fingerle ve Schulte-Spechtel, 2007).

Mikrobiyolojik tanı için örnek seçimi

Tanı için örnek seçerken kültür ve "Polymerase chain reaction" (Polimeraz zincir reaksiyonu) (PCR) için en ideal örnek cilt biyopsi örnekleridir. Artrit için tercih edilmesi gereken örnek genel olarak, sinoviyal sıvıda PCR çalışılmasıdır. Sinoviyal sıvı dışındaki vücut sıvılarından zayıf sonuçlar elde edilmektedir (Wilske ve diğerleri, 2007). Antikor tayinleri için serum veya özellikle LNB olgularında beyin omurilik sıvısı (BOS) tercih edilmelidir (Halperin, 2019b). BOS örneklerindeki antikor düzeyinin serum örneklerindeki antikor düzeylerine oranı anti-*Borrelia* antikor indeksi olarak adlandırılmaktadır ve intratekal antikor yapımının olduğunu göstermektedir. BOS örneklerinde serum örneklerine göre yüksek oranda antikor saptanması enfeksiyonunun MSS'nde olduğunu göstergesidir. BOS örneğinde antikor analizi yapılacaksa hastadan eş zamanlı olarak alınan serum ve BOS örneğinden (BOS/serum antikor indeksinin belirlenmesi) birlikte çalışılmalıdır (Theel, Aguero-Rosenfeld, Pritt, Adem ve Wormser, 2019). Hastalardan çıkarılan

kenelerin morfolojik olarak incelenmesi yalnızca epidemiyolojik veya diğer bilimsel çalışmalar için yapılmalıdır (Schutzer ve diğerleri, 2018; Wilske ve diğerleri, 2007). Lyme borelyoz için klinik olguların tanımı ve gerekli olan laboratuvar testleri Çizelge 2.3'te özetlenmiştir (Zajkowska, 2014).

Çizelge 2.3. Lyme borelyoz için klinik olguların tanımı ve gerekli olan laboratuvar testleri

Terim	Olgunun klinik tanımı	Laboratuvar kanıtı: Gerekli	Laboratuvar kanıtı: Destekleyici
ECM	Kırmızımsı tipik düz kenarlı görünüm (≥ 5 cm çapında)	Gerek yok	<i>B.burgdorferi</i> sensu lato'nun cilt biyopsisinden kültür ve/veya PCR ile saptanması
BL (nadir)	Ağrısız mavimsi-kırmızı nodül veya plak, genellikle kulak lobunda, kulak sarmalında, meme ucunda veya skrotumda, çocuklarda (özellikle kulakta) yetişkinlere göre daha sık görülür	Serokonversiyon veya pozitif seroloji, belirsiz vakalarda histoloji	Histoloji, <i>B.burgdorferi</i> sensu lato'nun cilt biyopsisinden kültür ve/veya PCR ile saptanması
ACA	Genellikle ekstremitelerin yüzeylerinde uzun süredir devam eden kırmızı veya mavimsi-kırmızı lezyonlar, ilk şişlikler, lezyonların sonunda atrofik hale gelmesi, kemik çıkıntıları üzerinde olası cilt sertleşmesi ve fibroid nodüllerin görülmesi	Yüksek seviyede <i>Borrelia</i> spesifik serum IgG antikorları	Histoloji <i>B.burgdorferi</i> sensu lato'nun cilt biyopsisinden kültür ve/veya PCR ile saptanması
LNB	Yetişkinlerde, meningoradikülit, menenjit, nadiren ensefalit, miyelit, çok nadiren serebral vaskülit, çocuklarda, esas olarak menenjit ve yüz felci	Pleositoz ve intratekal spesifik antikor sentezinin gösterilmesi	<i>B.burgdorferi</i> sensu lato'nun kültür ve/veya BOS'dan PCR ile saptanması, total IgM, IgG ve/veya IgA'nın intratekal sentezi, spesifik serum antikorları
LA	Bir veya birkaç büyük eklemden tekrarlayan kalıcı eklem şişlikleri	Genellikle yüksek konsantrasyonlarda tespit edilen <i>Borrelia</i> spesifik serum IgG antikorları	Sinoviyal sıvı analizi <i>B.burgdorferi</i> sensu lato'nun sinoviyal sıvı ve/veya dokudan PCR ve/veya kültür ile saptanması
Lyme karditi (nadir)	Akut atriyoventriküler (I-III) iletim bozuklukları, ritim bozuklukları, bazen miyokardit veya pankardit başlangıcı	<i>Borrelia</i> spesifik serum antikorları	<i>B.burgdorferi</i> sensu lato'nun endomiyokard biyopsisinden kültür ve/veya PCR ile saptanması
Oküler belirtiler (nadir)	Konjonktivit, üveit, papillit, episklerit, keratit	<i>Borrelia</i> spesifik serum antikorları	Son zamanlarda veya eşlik eden Lyme borelyoz belirtileri, <i>B.burgdorferi</i> sensu lato'nun kültür ve/veya oküler sıvıdan PCR ile saptanması

ECM: Eritema kronikum migrans, BL: Borrelial lenfositoma, LNB: Lyme nöroborelyoz, ACA: Akrodermatit kronika atrofikans, LA: Lyme artriti.

Doğrudan tespit yöntemleri

Mikroskopi ve kültür

Spiroketlerin mikroskopik olarak incelenmesi için gram boya ile zayıf boyanmaları nedeniyle ışık mikroskobu yerine karanlık alan mikroskobu kullanılmaktadır (Steere ve diğerleri, 2016). *Borrelia* tanısında bakterinin izolasyonu için özel bir besiyeri olan BSK besiyeri tercih edilir. Kültürde izolasyonun zor ve uzun (*B.burgdorferi*'nin üretim süresi yaklaşık 7-20 saat) bir uğraş gerektirmesi nedeniyle rutin laboratuvarlarda tercih edilmemektedir (Middelveen ve diğerleri, 2014). Hastalarda gözlenen klinik tablo, antikor testi negatif olarak gelse bile (seronegatif Lyme borelyoz) kültür yöntemi, seyahat edenlerde veya immün yetmezliği olan şüpheli hastalarda yardımcı olabilir (Wilske ve diğerleri, 2007).

Moleküler çalışmalar

Artrit vakalarından alınan sinoviyal sıvı örnekleri ve BOS örneklerinden direk olarak bakteri DNA'sı "Real-time PCR" (gerçek zamanlı PCR) (RT-PCR) yöntemi ile izole edilebilir (Steere ve diğerleri, 2016). Ancak BOS örneklerinde PCR'ın duyarlılığı oldukça düşüktür. DNA izolasyon yöntemleri uzmanlaşmış laboratuvarlar tarafından *OspA* ve *OspB* gibi plazmid kaynaklı genler, flagellar protein veya protein 66 (p66) için kromozomal genler veya 16S ribosomal RNA (16S rRNA) veya 5S/23S rRNA gen gibi çeşitli sekansları hedef alınarak çalışmaktadır. Ancak maliyet yüksekliği ve emek gerektiren bir yöntem olması nedeniyle rutin laboratuvarlarda tercih edilmez (Borchers ve diğerleri, 2015; Rizzoli ve diğerleri, 2011).

Serolojik testler / Antikor tespiti

B.burgdorferi antikorlarını tespit eden serolojik analizler, Lyme hastalığının rutin tanısında kullanılmaktadır. "Food Drug Administration" (Gıda ve İlaç İdaresi) (FDA) önerileri doğrultusunda şu an yaygın olarak kullanılan yöntem ELİSA adı verilen test ile *Borrelia*'ya spesifik IgG ve IgM antikorlarının saptanmasıdır. ELİSA testi sonucunda pozitif veya şüpheli bulunan örnekler WB yöntemi ile mutlaka doğrulanmalıdır (Zajkowska, 2014). ELİSA testi hastalığın akut ve konvelasan

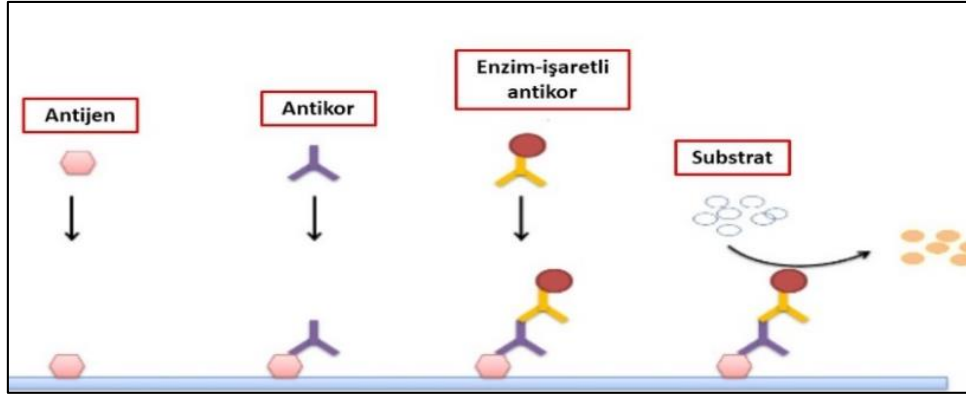
dönemlerinde mutlaka yapılmalıdır. Enfeksiyonu takip eden ilk 1 ay içerisinde Borrelia WB IgG yanıtının duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksektir (Borchers ve diğerleri, 2015). Ancak ELİSA testinin yalancı negatiflik ve/veya pozitiflik verebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Kene öyküsü (kene teması ve/veya kene ısırması) olan, endemik bölgelere seyahat etmiş ve farklı klinik tablolar gösteren hastalarda klinisyenler tarafından Lyme hastalığı akla getirilmelidir. Tanı için CDC'nin oluşturduğu tanı algoritmasına göre ilerlenebilir (Şekil 2.11) (Miraglia, 2016; Steere ve diğerleri, 2016).



Şekil 2.11. CDC kriterlerine göre Lyme seroloji takibi ("Two-tier test") (Miraglia, 2016; Steere ve diğerleri, 2016)

- ELİSA

ELİSA testi Lyme borelyozun serolojisinde en sık kullanılan test tekniğidir. Bu teknik *B.burgdorferi* antijenine karşı oluşan antikorların saptanması ilkesine dayanmaktadır (Aguero-Rosenfeld, 2008; Aguero-Rosenfeld ve diğerleri, 2005). Antikor içeren serum örneği, plak üzerine kaplanmış Borrelia antijenleri ile enzim işaretli konjugat arasında sandviç metodu ile inkübe edilir (Şekil 2.12). İnkübasyon sonrasında eklenen enzim-substrat reaktifinin eklenmesi ile renk değişimi meydana gelmektedir. Rengin yoğunluğu antikor seviyesi ile orantılıdır. Bu renk değişimi hastanın serumundaki IgM ve IgG antikorlarının spesifik olarak antijen kaplı kuyucuklara bağlanmasından kaynaklanır. Test sonucunda elde edilen optik yoğunluk spektrofotometre ile ölçülerek Borrelia antikorları tespit edilir (Baid, 2016; Zajkowska, 2014).



Şekil 2.12. ELİSA yöntemi (Baid, 2016)

ELİSA testinin en önemli avantajlarından biri, fazla miktarda numuneye gereksinim olmaması, mikropalak yöntemi olması nedeniyle tek bir örnekte bile çalışılacak bir test oluşu diğeri ise doğrulama testi olan WB'ye göre daha düşük maliyetli olmasıdır. ELİSA testleri genellikle üretici firmaların önerileri doğrultusunda çalışılmaktadır (Gajović, Todorović, Nešić ve Lazić, 2010; Zajkowska, 2014).

ELİSA hem bilimsel hem de diagnostik amaçlar için biyomedikal araştırmalarda kullanılan, tarama testi olarak önerilen en yaygın test yöntemidir. Ancak ELİSA testi tedavi takibi ve başarısını izlemede tercih edilmez. Tespit edilen antikorların varlığı mikroorganizma tedavi edilerek yok edilse bile birkaç ay hatta yıllar boyunca yüksek kalabilmektedir. Bu durum yanlış tanı ve hastaların gereksiz yere antibiyotik kullanmalarına neden olmaktadır (Borchers ve diğerleri, 2015; Gajović ve diğerleri, 2010; Wilske ve diğerleri, 2007).

ELİSA testleri kalitatif, yarı kantitatif veya kantitatif olabilmektedir. Tarama testi olarak ilk aşamada kullanılan ELİSA, sentezlenmiş (rekombinant antijen) zenginleştirmeye bir veya daha fazla kültürlenmiş patojenik genotipten (doğal antijenler) elde edilen antijenlerin biraraya getirilmesi ile meydana gelir (Baid, 2016). *Borrelia* tanısı için genellikle ticari ELİSA ve WB kitleri içerisinde *B.burgdorferi sensu stricto*, *B.garinii* ve *B.afzelii* türlerine ek olarak OspC, VlsE, p100/83, BmpA/p39, Fla/p41 gibi spesifik antijenler kullanılmaktadır (Best, Tschaepe ve Wilson, 2019; Dickeson, Chen ve Sintchenko, 2016). ELİSA ve WB tanı kitlerinde antikorları tespit etmeye yarayan seçili antijenler ve özellikleri Çizelge 2.4'te verilmiştir (Zajkowska, 2014).

Çizelge 2.4. ELİSA ve WB tanı kitlerinde antikorları tespit etmeye yarayan seçili antijenler ve özellikleri (Zajkowska, 2014)

Tanımlanmış antijen	Antijenin tanımı	Tanıdaki yarar	Biyolojik önem
OspA (34 kDa)	Dış yüzey proteini	OspA'ya karşı antikor gelişimi, uzun süreli artrit vakalarının başlangıcına doğru meydana gelir	-
OspB (31 kDa)	Dış yüzey proteini	-	-
OspC (21-24 kDa)	Plasmid kodlu lipoprotein Tanıda farklı türlerden elde edilmiş ortak mix protein olarak kullanılır	Spesifik Lyme borelyozun erken belirtileri için IgM serolojisinde önemli bir belirteç OspC'nin enfeksiyonun erkenden oluşmasında ve gelişmesinde rol oynayan önemli bir virulans faktörü olduğu düşünülmektedir <i>B.burgdorferi</i> , antikorların gelişmesine yanıt olarak OspC ekspresyonunu azaltır	Enfeksiyonun başlangıcı için OspC gereklidir
OspD (28 kDa)	Dış zarı kapsayan porin (Oms28)	<i>B.burgdorferi</i> için spesifik	-
OspE (19.2 kDa)	Dış yüzey proteini, kompleman faktörü H bağlayan protein	OspE hem insanlarda hem de memelilerde eksprese edilir ve güçlü tepkiler (hiper değişken bölgeler sayesinde) ortaya çıkarır	-
OspF (26.1 kDa)	Dış yüzey proteini	-	-
VlsE (35 kDa)	Yüksek derecede immünojenik epitoplar gösteren yüzeye maruz kalan lipoprotein VlsE, Ip28-1 kodlu, 35 kDa antijeni	Spesifik Erken Lyme borelyozlu hastaların serumlarında IgM serolojisinde özellikle VlsE'ye karşı reaktiviteler gözlenir IgG serolojisinde, erken veya ileri Lyme borelyoz hastalarının serumlarında VlsE'ye karşı reaktiviteler gözlenir	<i>B.burgdorferi</i> sensu lato, aktif bir bağışıklık yanıtına rağmen enfekte olmuş memeli konaklarında devamlılık gösterir. Bu durum kısmen VlsE yüzey proteininin kombine edici antijenik varyasyonundan kaynaklanır ve bakteriye "bağışıklıktan kaçış" mekanizması sağladığı düşünülmektedir
BmpA/p39 (39 kDa)	Borrelial membran protein A (BmpA) Kromozomal olarak kodlanmış	Yaygın Lyme borelyoz için IgG serolojisinde oldukça spesifik	-
Fla/p41 (41 kDa)	Flagellin	Nonspesifik	Bakterinin hareketini destekler
p58	-	-	-
P100/83 (83–100 kDa)	p83 yüksek moleküler kütle proteini Kromozomal olarak kodlanmış	Son derece spesifik Geç borelyozun temel belirteci ortaya çıkar ve <i>Borrelia</i> enfeksiyonunun geç aşamasında oldukça stabildir LNB ve artritli olgularda spesifik ancak ECM'de nonspesifik	<i>B.burgdorferi</i> sensu lato'da korunan protoplazmik silindire ilişkili antijen
DbpA/Osp17 (17–18 kDa)	Dekörin bağlayıcı protein A	-	-
DbpB/p18	Dekörin bağlayıcı protein B	-	-

- IFA

Borrelia IFA testinde cam slaytlara sabitlenmiş mikroorganizmalar kullanılır. Serum örnekleri, spesifik olmayan antikorları uzaklaştırmak için emici madde içeren preparatlarda seyreltilir. “Fluorescein isothiocyanate” (Floresein izotiyosiyanat) (FITC) işaretli anti-insan IgG veya IgM konjugat ilave edildikten sonra antikorların varlığı floresan mikroskopisi 20X ve/veya 40X büyütme ile incelenerek tespit edilir (Aguero-Rosenfeld ve diğerleri, 2005). IFA testinin sınırlamaları el alındığında slaytların incelenmesi için floresan mikroskopisine ve iyi eğitilmiş personele ihtiyaç duyulması ile yorumlamadaki öznellikten söz etmek mümkündür (Aguero-Rosenfeld, 2008).

- WB

Yeni ve sürekli geliştirilen testlerin varlığına rağmen, Lyme hastalığının laboratuvar tanısı için hala bir mücadele verilmektedir. Lyme borelyozdan sorumlu genotipler arasında farklı ve değişken antijenlerin bulunması tanıyı zorlaştırmaktadır. Genotip çeşitliliği, farklı coğrafik dağılımlar standart tanı kriterleri olsa da ABD, Avrupa ve Asya için aynı değildir (Stanek ve diğerleri, 2012; Steere ve diğerleri, 2016). “Two-tier” test önerisine göre ELİSA ile pozitiflik saptanan durumlarda WB ile doğrulama yapmak gerekmektedir. WB diğer adıyla immünoblot yönteminde, mikroorganizmanın tek tek bileşenlerine karşı antikorların saptanabilmesi sağlandığından *B.burgdorferi* için ELİSA'dan daha fazla bilgi sağlamaktadır. WB testi hem IgM hem de IgG antikorlarını tespit etmek için kullanılabilir. Spesifik antijenlere karşı oluşan antikorların varlığı bantlar şeklinde görülebilir. Elde edilen sonuçlar test kiti içerisinde belirtilen kontroller ile karşılaştırılarak görsel olarak değerlendirilebilir veya bantların yoğunluğunu ölçen bir tarayıcı tarafından okunabilir. Ancak, bu testler de farklı genotipler nedeniyle standartlaştırılmamıştır (Halperin, 2019a; Wormser ve diğerleri, 2014). ABD'deki WB test kitlerinin sonuçları CDC verilerinde belirtilen “two-tier” stratejisine göre IgG için 10 banttan ≥ 5 bant, IgM için ise 3 banttan ≥ 2 bant pozitif olarak değerlendirilmiştir (Mead ve diğerleri, 2019). Avrupa'nın test sonuçlarını yorumlama kriterleri ise oldukça farklıdır. Avrupa'ya göre immünoblot testleri için değerlendirme yapıldığında ise IgG için ≥ 2 bant, IgM için ise ≥ 1 bant pozitif olarak değerlendirilmektedir (Hauser, 2019).

- Omik teknolojileri ve Lyme hastalığı

Omik teknolojileri, türler arasındaki farklılıklar ile proteinler, metabolitler ve diğer moleküller arasındaki farklılıkların incelenmesine izin veren son yıllarda üzerinde çok fazla araştırma yapılan yöntemlerdendir. Bu yöntemler nedeni bilinmeyen hastalıkların etiyolojisini, kısa sürede tanımlanmalarını ve hastalıkların önlenmesini aydınlatmak için kullanılmaktadır (Sindelar, 2019). Lyme etiyolojisini tanımaya, hastalığın erken tespiti ve teşhisi için biyobelirteç belirlemede omik teknolojisi mevcut bilgilerin (insanlar üzerinde Lyme hastalığı için genom çalışmasının tam olarak yapılmamış oluşu) az olması nedeniyle bazı zorluklara neden olmaktadır. Ancak bu teknolojilerin transkriptom, proteom ve metabolomlar üzerindeki analizleri son dönemlerde Lyme hastalığının erken tanısı için yeni bir umut olma yolundadır. Hedeflenen belirteçler sayesinde Lyme serolojisinde kullanılan testlerin düşük duyarlılığını yenerek Lyme'in erken sürede tanımlanabilmesine olanak sağlayabilmektedir (Bouquet ve diğerleri, 2016; Molins ve diğerleri, 2015).

Mikroarray tekniklerindeki gelişmeler, gen ekspresyon analizleri, kütle spektrometrisi ve biyoinformatik, Lyme hastalığında tanı ve prognostik belirteçlerin gelecekteki keşfedilebilmesi için büyük umutlara neden olmaktadır. Transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi omik teknolojileri Lyme hastalığının erken dönemlerinde immün yanıtlarının nasıl olduğu, hastalığın alt tipleri ve tedaviye hastaların nasıl yanıt verdikleri ile ilgili veri sağlayabilir. Ancak coğrafi değişiklikler, yaşam koşulları, hastaların altta yatan diğer hastalık durumları, daha fazla örnekleme ihtiyaç duyulması gibi nedenler bu konuda daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir (Badawi, 2017; Kuleš ve diğerleri, 2016).

2.8. *B.burgdorferi*'ye Karşı Korunma ve Tedavi

Korunma

Hastalıklara özellikle enfeksiyon hastalıklarına karşı yapılacak en iyi mücadele yöntemi korunmaktır. Lyme hastalığında etkin bir halk sağlığı için hastalığın dağılımı, başlangıç noktası ve riskli alanlar hakkında doğru bilgilerin bilinmesi

gerekmektedir. Bu bilgilerin elde edilmesi hastalığı önlemek ve kontrol etmek için önemlidir (Beard, 2014). Hastalığa spesifik bölgelerin ve epidemiyolojik risklerin belirlenmesi ile risk altındaki topluluklarda farkındalığın artırılması sağlanacaktır (Borchers ve diğerleri, 2015). Sağlık çalışanlarına bu konuda verilecek eğitimler riskli bölgeler için önem teşkil etmektedir. Verilecek bu eğitimler sayesinde, hastalar kene kaynaklı enfeksiyonlarda vektöre maruz kalmalarını azaltmanın yolları hakkında bilgilendirilecek ve bu hastalıktan korunmaları sağlanacaktır (Beard, 2014).

Kene ile temas ve/veya ısırılma yıl boyunca ortaya çıkabilir, ancak keneler sıcak aylarda (Mart-Eylül) oldukça aktiftir. Bu nedenle Piesman ve Eisen'in derlemelerinde belirttikleri gibi riskli alanlarda böcek ilacı uygulamaları, peyzaj yönetimi, keneler tarafından enfekte olan konak geyiklerin takibi, keneleri uzaklaştırmak için itici veya toksik maddelerin cilt üzerine veya giysilere uygulanması önerilmektedir. Ayrıca kene açısından riskli bölgelerde (Orman, piknik, vs...) bulunduktan sonra duş alınması ve vücut üzerinde gerekli kontrollerin yapılması keneden korunmak için uygulanması gerekenler arasındadır (Piesman ve Eisen, 2008). Lyme borelyoz için en faydalı korunma aracı yetişkinler ve çocuklarda etkinliği ve güvenilirliği kanıtlanmış aşı olmalıdır. Şu anda Lyme hastalığı için mevcut böyle bir aşı bulunmamaktadır (Skotarczak, 2015).

CDC önerilerine göre

Kenelerin nerede olacağının bilinmesi dikkatli olmak için önemlidir. Kenelerin genellikle çimenli veya ağaçlık alanlarda, hatta hayvanlar üzerinde yaşadıkları göz önünde bulundurulmalıdır. Kamp yapmak, evcil hayvanları yürüyüşe çıkarmak, bahçe işleri veya avcılık ile uğraşmak keneler ile yakın temasa neden olabilir. Hatta birçok birey kendi bahçesinde keneler tarafından böylelikle enfekte olabilmektedir. Bu nedenle dışarı çıkmadan kıyafetlere ve kullanılan ekipmanlara %0,5 permetrin içeren ürünler uygulamak kenelerden korunmak için alınacak tedbirler arasındadır. Kenelerin giysiler üzerinde taşınabileceği düşünülerek kıyafetlerin kontrolü, evcil hayvan besleniyorsa hayvanın kene yönünden iyice incelenmesi, vücudunuzda kenenin olup olmadığının kontrol edilmesi, duş alınması gibi önlemlerde kenelerin

kontrolünün yapılması Lyme hastalığından korunmada önem arz etmektedir (Centers for Disease Control and Prevention, 2021).

Tedavi

Kene ısırması sonrasında profilaksi uygulanıp uygulanmaması için farklı öneriler mevcuttur (Hatchette ve diğerleri, 2014). Profilaksi için yapılan bilimsel çalışmalar Lyme hastalığının endemik olduğu bölgelerde kene çıkarıldıktan sonraki 72 saat içerisinde antibiyotiklerin uygulandığını belirtmektedirler (Biesiada ve diğerleri, 2012; Nadelman ve diğerleri, 2001). Randomize plasebo kontrollü yapılan bir çalışmada, ilk kez tek bir doz doksisiklinin Lyme hastalığı oranını azaltabileceği gösterilmiştir (Nadelman ve diğerleri, 2001). Plasebo çalışmanın etkinliği Sutton ve Spry (2019) tarafından yayınlanmıştır. *B.burgdorferi* enfeksiyonu olan hastalar asemptomatik olsa da çoğu erken bir aşamada tedavi edilmezse sırasıyla, erken lokalize hastalık (genellikle maruziyetten <30 gün sonra), erken yayılan hastalık (<maruziyetten 3 ay sonra) ve geç yayılmış hastalık (maruziyetten>3 ay sonra) görülebilir (Halperin, 2019a; Hatchette ve diğerleri, 2014). Lyme hastalığının tedavisi, hastalığın dönemlerine ve tuttuğu sisteme bağlı olarak değişmektedir (Biesiada ve diğerleri, 2012; Hatchette ve diğerleri, 2014). “Infectious Diseases Society of America” (Amerika Bulaşıcı Hastalıklar Derneği) (IDSA) tarafından geliştirilen tedavi uygulama rehberinde kullanılacak antibiyotikler ve dozları özetlenmiştir. IDSA rehberi özellikle Lyme tedavisinde olguların yaşlarına göre ve ECM, merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu, kardiyak tutulum gibi Lyme hastalığının dönemlerine ve olguların klinik özelliklerine göre belirli antibiyotiklerin uygun dozlarda uygulanması gerektiğini önermektedir (Lantos ve diğerleri, 2021).

2.9. *B.burgdorferi*'ye Karşı İmmun Yanıt

Borrelial enfeksiyonların yeniden yaygınlaşması *B.burgdorferi*'nin kronikleşen bir sağlık problemi olduğunu göstermektedir. Yaşam döngüsüne bakıldığında *B.burgdorferi*, hem konağın hem de vektörün farklı çevresel koşullarıyla karşılaşmaktadır. *B.burgdorferi*'nin hayatta kalabilmesi için konak bağışıklık sisteminden kaçması öne çıkan önemli özelliklerinden birisidir. Bakterinin konak

savunma mekanizmalarından kaçmak için kullandığı farklı mekanizmalar rapor edilmiştir (Aslam, Nisar, Khurshid ve Farooq Salamat, 2017).

Erken Lyme borelyoz belirtileri genellikle kenenin ısırmasından 1-2 hafta sonra başlar ve hastaların bir kısmında 4 hafta veya daha uzun sürebilen yorgunluk, halsizlik, ateş, titreme, kas ve baş ağrısı ile eşlik edebilen karakteristik ECM döküntüleri gelişir. Tedavi edilmediği takdirde, bakteriler lenfatik sistem veya kan yoluyla eklemlere, sinir sistemine ve kardiyovasküler sisteme sistematik olarak yayılabilir. Erken yaygın Lyme borelyoz belirtileri kene ısırmasından haftalar ile aylar sonra ortaya çıkabilir ve uyuşma, Bell's palsy, çarpıntı, göğüs ağrısı veya nefes darlığı ile kendisini gösterebilir. Enfeksiyondan yaklaşık 6 ay sonra, hastalar eklem ağrısı ve eklemlerde şişlik gibi inflamatuvar bulgular ile başvurabilirler. İlk kez kene ısırmasından aylar veya yıllar sonra, Lyme borelyoz geç yaygın döneme ilerleyebilir hatta bu durum tekrarlayan kronik artrit, kardit gibi morbidite ve mortalitelere yol açabilir. Artrit vakaları genellikle geç hastalık aşamasında ortaya çıkar ve tedavi edilmeyen hastaların %60'ında görülmektedir. Bu dönemde ayrıca nörolojik ve kardiyak tutulumlar da tanımlanmıştır (Wright, Riedel, Talwani ve Gilliam, 2012). Enfeksiyon gelişiminden sonra doğal ve adaptif immün yanıtların gelişmesiyle hastalar, hastalığın erken aşamasında antibiyotik tedavisi almadan bile iyileşebilirler. Erken dönemde antibiyotiklerle tedavi edilen Lyme borelyoz hastalarında serolojik yönden tespit edilebilecek antikorlar gelişmemektedir (Aucott ve diğerleri, 2009; Wormser, 2006). Erken Lyme borelyoz'da tedavi edilmeyen hastaların çoğunda Bell's palsy ve menenjit gibi nörolojik bulgular, çoklu ECM lezyonları ve daha az yaygın olarak da miyokardit görülebilir (Ogden, Lindsay, Morshed, Sockett ve Artsob, 2009; Ray ve diğerleri, 2013; Wormser ve diğerleri, 2006). Kene ısırması sonrası etkilenen dokularda spiroket veya antijenleri tarafından tetiklenen inflamasyonun, hem erken hem de geç yaygın hastalık dönemlerinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Rahman, Shering, Ogden, Lindsay ve Badawi, 2016; Soloski ve diğerleri, 2014). Erken inflamatuvar yanıtların meydana gelmesi benzer klinik özellik gösterebilen hastaları sağlıklı bireylerden ayırmaya yardımcı olmaktadır (Soloski ve diğerleri, 2014). Patojen mikroorganizma ve konak immün yanıtı arasındaki etkileşimin ne ve nasıl olduğu, immünolojik yollardaki mekanizmaların tespit edilmesi hastalığın patogenezinin açıklanmasında da önemli bir rol oynamaktadır (Rahman ve diğerleri, 2016; Soloski ve diğerleri,

2014). Bu mekanizmaların belirlenmesi yeni tanı tekniklerine hedef olabilecek ve tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olabilecek farklı klinik tutulumlarda (ECM, LA, LNB gibi) bile olsa hastalığın erken tespit edilebilmesi için bir dizi biyobelirteçlerin bulunmasına katkıda bulunmaktadır (Rahman ve diğerleri, 2016).

2.9.1. Doğal (innate) immün yanıt ve çeşitli evazyon mekanizmaları

Vücudumuzun yabancı mikroorganizmalara, kimyasal ve fiziksel ajanlara maruz kalmasının ardından konak savunmasının ilk adımı doğal bağışıklığın aktivasyonudur. Enfeksiyöz ajanı izole etmek veya tamamen ortadan kaldırmak, hasarlı bölgeyi ve/veya dokuyu onarmak ve homeostazi yeniden dengede tutabilmek doğal bağışıklığın görevleri arasındadır (Beutler, 2004).

Keneler, *B.burgdorferi*'nin konak doğal immün yanıtlarından kaçabilmesine aracılık ederler. *B.burgdorferi*, kenenin beslenmeye başlamasının ardından 16 ile 72 saat içinde konak savunma sistemi ile karşılaşmaktadır. Keneden salgılanan tükürük içerisindeki proteinler, konağın bağışıklık sisteminin baskılanmasında rol oynar (Cook, 2015). Bu baskılanma ile beraber sitokin ve kemokin üretimi ve granülosit alımının inhibisyonu da dahil olmak üzere, ciltte yerleşmiş makrofajların ve dendritik hücrelerin aktivasyonunun da inhibisyonu meydana gelmektedir (Kazimírová ve Stibraniova, 2013; Kotál ve diğerleri, 2015). Keneden salgılanan, OspC ile etkileşen ve spiroket üzerinde "Membrane attack complex" (membran atak kompleks) (MAC) oluşumunu inhibe eden Salp 15'in kompleman sisteminin alternatif yolunun aktivasyonuna müdahale ettiği bilinmektedir. Lyme borelyoz gelişiminde önemli olan kene-konak-patojen etkileşimlerinin şematik genel görünümü Şekil 2.13'te gösterilmiştir (Hovius, van Dam ve Fikrig, 2007; Kazimírová ve Stibraniova, 2013; Schuijt ve diğerleri, 2008).

Çizelge 2.5. *B.burgdorferi*'nin memeli konak ile olan etkileşimi ve sağ kalımı üzerindeki etkisi

İmmün yanıt modülatörler	Etkiler
<i>B.burgdorferi</i> -konak arası ko-evrim	Virülans ve enfektiviteye neden olan genlerin konağa özel olması ile etki görülür
Keneye ait tükürük proteinleri Spiroket morfolojisi ve motilitesi	Konakta pro-inflamatuar yanıtları baskılar <i>B.burgdorferi</i> yayılmasını kolaylaştırır ve konaktaki kalıcılığı artırır
<i>B.burgdorferi</i> adezinleri	Konak dokularla etkileşime ve konaktaki kalıcılığa katkı sağlar
Konak interaktif proteinleri	Plazmin/plazminojen gibi konak enzimlere bağlanarak hücre dışı matriksin bozulmasını kolaylaştırır
CRASPlar*	Kompleman aktivasyonu inhibe ederek etki gösterir
Protein ekspresyonunda modülasyon	Konağa adaptasyon, immünojenik proteinlerin azalması ve antijenik varyasyon
Alternatif makrofaj aktivasyonu	Ekstraselüler matriks degranülasyonu gerçekleşir
IgM izotipinde düşük afiniteli antikorlar	Antikor yanıtının niteliği azalır

*CRASP: Complement regulator-acquiring surface protein

Bu tür proteinlerin önemli bir grubu, konak integrinlerini taklit eden adezinler ile bağlanan ve göçü kolaylaştıran moleküller olarak bilinmektedirler. Bu moleküller sayesinde *B.burgdorferi*'nin lehine gelişebilecek bağışıklık yanıtında görev alan hücrelerin göç etmesini sağlayan mekanizmalar ortadan kalkmaktadır. Bakteriyel adezinler, bakterileri koruyan, konak hücredeki sinyal mekanizmalarını tetikleyen, ana dokulara girmelerini kolaylaştıran önemli virülans faktörlerindendir (Kline ve diğerleri, 2009). *B.burgdorferi*'nin "Fibronectin-binding protein 32" (Fibronectin bağlayıcı protein 32) (BBK32) olarak bilinen proteini glikozaminoglikanlara bakteriyel bağlanmayı sağlayan önemli bir adezindir (Ebady ve diğerleri, 2016). *B.burgdorferi*'nin bir başka adezyon proteini olan protein 66 (p66)'nın, spiroketin kan damarlarından dokulara ekstravazasyonunu kolaylaştırmak için konak damarı üzerindeki ligandlarla etkileşime girdiği gösterilmiştir (Kumar ve diğerleri, 2015). *B.burgdorferi* ayrıca DbpA/p17 ve DbpB/p18 proteinlerini de eksprese etmektedir. Bu proteinlerdeki yüzey ekspresyonunun doku kolonizasyon seviyesini arttırdığı görülmektedir (Shi, Xu, Seemanapalli, McShan ve Liang, 2008).

Komplement dirençli *Borrelia* izolatları, p66, DbpA/p17 ve DbpB/p18 gibi "Complement regulator-acquiring surface protein" (CRASP) ve "OspEF-related proteins" (OspEF ilişkili protein) (Erp) adı verilen dış yüzey proteinlerini de eksprese

etmektedir. Şu ana kadar beş farklı CRASP proteini tanımlanmıştır (Hallstrom ve diğerleri, 2010; Kraiczy ve Stevenson, 2013). Tanımlanmış beş farklı proteinden en önemlisi CRASP-1, kenenin konağa bulaşması sırasında artarken kalıcı enfeksiyon esnasında azalır (Bykowski ve diğerleri, 2008). Erp proteinleri ise çeşitli dokulara yayılması sırasında spiroketin yüzeyinde eksprese edilir (Miller, von Lackum, Babb, McAlister ve Stevenson, 2003).

B.burgdorferi için tanımlanmış bu proteinlerin tümü bakterinin immün yanıtı kaçıışına neden olan mekanizmaların içerisinde yer almaktadır. *B.burgdorferi*'nin immün yanıtı kaçıış mekanizması Çizelge 2.6'da gösterilmiştir (Christodoulides ve diğerleri, 2017).

Çizelge 2.6. *B.burgdorferi*'nin immün yanıtı kaçıış mekanizması

İmmün yanıtı kaçıış mekanizması

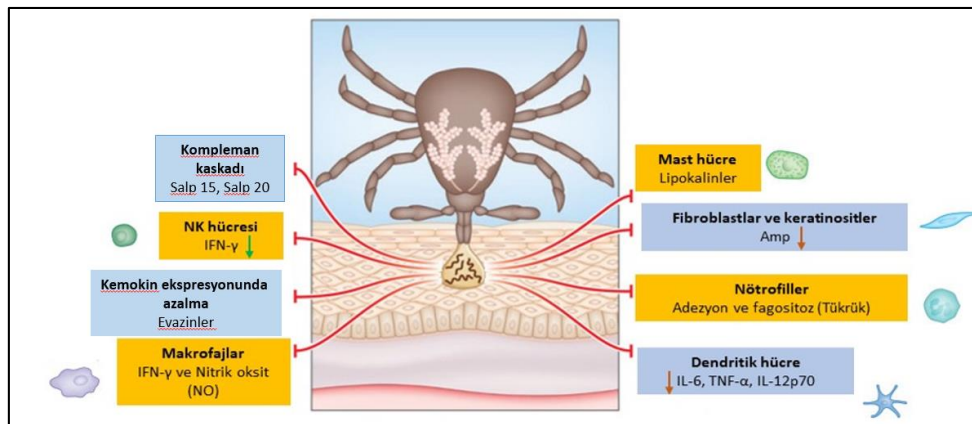
Antijenik varyasyon (OspC ve VlsE proteinleri)

Kompleman aracılı lizisin önlenmesi (OspE, Erp, CspA proteinleri)

Nötrofil fonksiyonunda bozulma (BBA57)

*** OspC: Outer surface protein C, VlsE: Variable surface lipoprotein E, OspE: Outer surface protein E, Erp: OspEF-related protein, CspA: Complement surface protein A, BBA57: *B.burgdorferi* virulence factor

Doğal hücresel immün yanıt ile karşılaşıldığında, spiroketal lipoproteinler TLR-2 tarafından tanınır (Wooten ve diğerleri, 2002). TLR-2'nin proteinleri tanınması ile İnterlökin-1 β (IL-1 β), İnterlökin-6 (IL-6), Tümör Nekroz Faktör (TNF) ve İnterlökin-12 (IL-12) gibi inflammatuar sitokinlerin salgılanmasıyla monositlerin ve nötrofillerin aktivasyonu meydana gelmektedir (Sjöwall ve diğerleri, 2005). Kenenin salgıladığı tükürük ile doğal bağışıklık yanıtının inhibisyonu Şekil 2.15'te gösterilmiştir (Hovius, 2009).



Şekil 2.15. Doğal bağışıklık yanıtının kene tükürüğü ile inhibisyonu (Hovius, 2009)

Doğal immün yanıt bileşenleri arasında keratinositler, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler ve lipoproteinlerin varlığına cevap verebilen diğer hücreler bulunmaktadır (Christodoulides ve diğerleri, 2017). Spiroketlerin immün yanıt mekanizmaları incelenirken spiroketal proteinlerin ve doğal bağışıklıkta rol alan bu hücrelerin fonksiyonlarının daha iyi anlaşılması immünpatogeneze ışık tutacaktır (Montgomery, Lusitani, de Boisfleury Chevance ve Malawista, 2002).

Nötrofiller

Nötrofiller, akut bakteriyel enfeksiyonların immünopatogenezinde de önemli bir role sahip mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattını oluşturan hücrelerdir. OspB gibi spiroketal lipoproteinlerin, nötrofil fonksiyonunu inhibe ettiği ve çeşitli dokularda oksidatif patlamayı önlediği, konağın enfeksiyonunu uzattığı gösterilmiştir (Hartiala ve diğerleri, 2008). *B.burgdorferi* nötrofiller tarafından fagosit edilir. Ancak OspB gibi spiroketal lipoproteinler nötrofillerin bu fonksiyonunu inhibe ederek konakta uzun süreli enfeksiyon oluşmasına neden olurlar. Örneğin, OspA pikomolar (pM) düzeyindeki düşük konsantrasyonlarda sunulduğunda bile, nötrofillerin aktivasyonunda ve kemotaksisinde rol oynadığı görülmüştür (Morrison, Weis ve Weis, 1997). Nötrofil aktivasyonunun ardından nötrofil doku infiltrasyonu, artrit ve miyokarditte baskın olan lokalize doku inflamasyonuna katkıda bulunmaktadır (Christodoulides ve diğerleri, 2017).

Dendritik hücreler

Nötrofiller ve monosit/makrofajların aktivasyonuna benzer şekilde spiroketler hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemini birbirine bağlayan anahtar bileşenlerden dendritik hücreler gibi hücreleri de aktive edebilme yeteneğine sahiptir. Spiroketler, "Intercellular Adhesion Molecule 1" (İntrasellüler Adezyon Molekülü 1) (ICAM-1) gibi hücre adezyon moleküllerini de aktive eder, bu molekül T hücresi etkileşimlerini kolaylaştırarak dendritik hücrelerin lenf nodlarına kolaylıkla göç edebilmelerini sağlar (Mason ve diğerleri, 2016). Spiroketal lipoproteinlerin dendritik hücreler üzerindeki etkileri, dendritik hücrelerin aşı yanıtlarında önemli bir rol oynaması nedeniyle oldukça önemlidir (Lieskovská ve diğerleri, 2015).

Monositler ve Makrofajlar

Nötrofiller dışında, monosit/makrofajlar da spiroketal immünopatogeneizde önemli bir rol oynamaktadır. Spiroketal lipoproteinler monosit/makrofajların membranındaki CD14 aracılığıyla monositik hücreleri aktive ederek etkileşime girerler (Benhnia ve diğerleri, 2005). Bu etkileşim Nf- κ B yolağını aktive eder ve pro-inflamatuar yanıtları indükler (Berende, Oosting, Kullberg, Netea ve Joosten, 2010). Spiroketal lipoproteinler bu pro-inflamatuar etkilerini CD14, TLR ve Nf- κ B sinyali dahil olmak üzere çeşitli yollardan monosit/makrofaj gibi hücreler ile İnterlökin-1 (IL-1) gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini indükleyerek gösterirler. Bu etkilerini ayrıca İnterlökin-10 (IL-10) gibi anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini indükleyerek de göstermektedirler (Christodoulides ve diğerleri, 2017; Sjöwall ve diğerleri, 2005).

Monositler, kan akışından dokulara göç ettikten sonra makrofajlara veya dendritik hücrelere dönüşebilen miyeloid kaynaklı dolaşım öncü hücreleridir. Hem makrofajlar hem de dendritik hücreler profesyonel antijen sunan, doğal bağışıklık yanıtında rol alan hücreler olarak bilinmektedirler (Jakubzick, Randolph ve Henson, 2017). Lyme borelyozda mononükleer hücrelerin hâkim olduğu inflammatuar hücreler tipik olarak lezyonların olduğu bölgelerde bulunmaktadır (Zhao, McCloud, Fleming ve Klempner, 2007).

Mononükleer hücreler üzerinde yapılacak in vitro çalışmalarda özellikle tercih edilen “human monocytic leukaemia cell line” olarak bilinen THP-1 ve pro-monositik, “human myeloid leukaemia cell line” olarak adlandırılan U937, çeşitli makrofaj tiplerine veya dendritik hücrelere ayrılabilen monositik hücre dizileridir. Bu hücre dizisi monositlerin birçok özelliğini sergiler ve kullanımı oldukça kolaydır. Kolaylıkla üretilen hücreler monositlerin bağlanması, monosit ve makrofaj farklılaşması gibi mekanizma araştırmalarında özellikle tercih edilen hücre dizileridir (Chanput, Peters ve Wichers, 2015).

Mikroglia

Mikroglial hücreler, MSS parankiminde bulunan benzeri olmayan miyeloid kökenli hücrelerdir. Monosit türevli makrofajlarla ortak bir soyu paylaşırsalar da, mikroglialar

farklı moleküler özelliklere sahiptirler (Sousa, Biber ve Michelucci, 2017). Beyin parankimi içerisinde yer alan mikroglialar MSS içerisindeki farklılıkları tespit ederek dışarıdan gelen zararlı uyarılara yanıt vermek üzere hızlıca aktive olabilirler (Salter ve Stevens, 2017). Bağışıklık yanıtındaki bu önemli fonksiyonlarının yanı sıra mikrogliaların sinapsis, nörogenez düzenlenmesi de dahil olmak üzere beyindeki diğer serebral süreçlerde rol aldığı ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde terapötik hedef olabilecekleri düşünülmektedir (Du ve diğerleri, 2017).

Mikroglialar ile in vitro olarak yapılan çalışmalarda tercih edilen "Human microglial clone 3 cell line" (HMC3) hücre hattının özellikle CXCR3 reseptöründe fazlaca eksprese olduğu LPS, IFN- γ ile uyarımlarda tercih edilmektedir. Ayrıca nörodejeneratif hastalık modellerinde yol gösterici bir hücre hattı olduğu bilinmektedir (Bachiller ve diğerleri, 2018; Flynn, Maru, Loughlin, Romero ve Male, 2003; Timmerman, Burm ve Bajramovic, 2018).

2.9.2. Adaptif (kazanılmış) immün yanıt

Adaptif immün sistem yabancı olarak kabul ettiği mikroorganizmaları ortadan kaldırmak için görev yapan ikincil ama ana savunma hattıdır. Adaptif bağışıklık yanıtının öncelikli fonksiyonları öz olmayan ("non-self") antijenlerin tanınması, öz ("self") ve öz olmayan antijenleri birbirinden ayırt etme, patojenleri veya patojenle enfekte olmuş hücreleri ortadan kaldıran patojene spesifik immünolojik efektör yolların oluşturulması ve spesifik bir patojeni hızla ortadan kaldırabilecek bir immünolojik belleğin geliştirilmesidir (Bonilla ve Oettgen, 2010; Marshall, Warrington, Watson ve Kim, 2018). Adaptif bağışıklık yanıtı aynı zamanda enfeksiyöz hastalıklara karşı geliştirilebilecek etkili aşılamanın temelini de oluşturmaktadır. Adaptif bağışıklık sisteminin asıl unsurları antijene özgü T hücreleri ve plazma hücrelerine farklılaşan B hücrelerinden oluşmaktadır (Marshall ve diğerleri, 2018).

B.burgdorferi'ye karşı oluşan adaptif bağışıklık yanıtı, hem humoral hem de hücre aracılı immün yanıtları içermektedir. Hem T hücresinden bağımsız hem de bağımlı B hücresi reaksiyonları, spiroketlerin ortadan kaldırılması için adaptif bağışıklık yanıtı sırasında önemlidir. Enfeksiyon sırasında *B.burgdorferi* antijenine spesifik

antikorlar üretilir ve bu antikorlar *B.burgdorferi* suşları ile yeniden enfeksiyon meydana geldiğinde enfeksiyonu önleyebilirler (Tracy ve Baumgarth, 2017). Antikor yanıtının meydana gelmesi ile dokulardan *B.burgdorferi*'nin azaltılması hatta yok edilmesi de mümkün olabilmektedir (Elsner, Hastey, Olsen ve Baumgarth, 2015). Lyme borelyoz hastalarında baskın olarak "T helper 1" (yardımcı T hücre 1) (Th1) tipi yanıtların hakimiyeti söz konusudur. Th hücrelerinin aktivasyonunun ardından, B hücreleri *B.burgdorferi*'ye spesifik olan IgM ve IgG antikorlarını üretmeye başlar (Radolf ve Samuels, 2010). Hem T hücre bağımsız hem de T hücre bağımlı farklı işlevlere sahip çok çeşitli yüzey proteinlerini temsil eden antijenler, humoral bağışıklık yanıtının hedefi haline gelmektedir (Barbour ve Benach, 2019; Elsner ve diğerleri, 2015).

2.9.3. Sitokin ve kemokinler

İnflamasyon, dokuların ve organların mikrobiyal patojenler, iritan maddeler veya toksik hücresel bileşenler gibi zararlı uyarılara maruz kalmasının bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Zararlı uyarıcıları ortadan kaldırması ve iyileşme sürecini başlatması nedeniyle sağlık için önemli bir role sahiptir (Medzhitov, 2010).

İnflamasyonun birincil fiziksel belirtileri kızarıklık, şişme, ısı, ağrı ve etkilenen bölgede işlev kaybının olmasıdır. Bu süreçte monositler, makrofajlar, nötrofiller, bazofiller, dendritik hücreler, mast hücreleri de dahil olmak üzere bağışıklık sisteminin ana hücreleri görev yapmaktadır (Takeuchi ve Akira, 2010). Bu durumda inflamatuvar lezyonlar incelendiğinde, herhangi bir lezyonda spesifik lökositlerin varlığı görülmektedir. Yani, inflamatuvar süreç, uygun lökositlerin görev yapmasını sağlayacak şekilde düzenlenmektedir. Bu süreçler, hem inflamasyonlu dokuya hücrelerin göç etmesi hem de inflamasyonu karakterize eden karmaşık hücre içi sinyal kontrol mekanizmalarına aracılık eden sitokin ve kemokin ailelerinin üyeleri dahil bir dizi hücre dışı moleküler düzenleyici tarafından kontrol edilir (Chen ve diğerleri, 2018).

Sitokinler, ağırlıklı olarak monositler, makrofajlar ve lenfositler dahil olmak üzere farklı hücrelerden salınan, hücrelerin farklılaşması, proliferasyonu ve üretiminden

sorumlu olan düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir (Dinarello, 2007; Turner, Nedjai, Hurst ve Pennington, 2014).

Pro- ve anti-inflamatuar sitokinler sırasıyla inflamasyonu destekler ve inhibe eder. İnflamatuar sitokinler, “Colony-stimulating factors” (Koloni uyarıcı faktörler) (CSF), IFN'ler, TNF'ler, “Transforming/tumor growth factor” (Tümör büyüme faktörü) (TGF) ve kemokinler olarak sınıflandırılır ve hücreler tarafından öncelikle lökositleri enfeksiyon veya yaralanmanın olduğu bölgeye göç ettirmek için üretilir (Turner ve diğerleri, 2014).

Sitokinler üretildikleri hücre üzerinde (otokrin etki), yakındaki hücrelerde (parakrin etki) veya uzak hücrelerde (endokrin etki) göstererek hareket edebilir. Bu nedenle bağışıklık sistemi hücrelerinin gelişimi ve düzenlenmesinde önemlidirler (Zhang ve An, 2007).

İnterferonlar

İnterferon ailesi, oldukça fazla eksprese edilen bir sitokin grubunu oluşturmaktadır. Tip I, Tip II ve Tip III interferonlar olarak üç ana sınıftan oluşmaktadırlar. Tip I interferonlar (IFN- α ve IFN- β), Tip II interferon (IFN- γ), Tip III interferon ise (IFN- λ) olarak bilinmektedir (Negishi, Taniguchi ve Yanai, 2018). Tip I IFN'ler, viral replikasyonu inhibe ederek, “Natural killer cells” (Doğal öldürücü hücreler) (NK)'ların lizis potansiyelini ve “Major histocompatibility complex I” (Majör doku uygunluk sınıf I) (MHC I) moleküllerinin virüs ile enfekte hücreler üzerindeki ekspresyonunu arttırarak ve Th1 hücrelerinin gelişimini uyararak güçlü bir antiviral etki gösterir. Enfeksiyöz bir süreç sırasında, bu tip interferonlar artar ve kanda kolayca saptanabilir. Tip II IFN'nin tek temsilcisi olan IFN- γ hem doğal hem de adaptif immün yanıtlarda makrofaj aktivasyonunda önemli bir rol oynar. İnterlökin 28/29 (IL-28/29) olarak da adlandırılan Tip III IFN'ler, viral enfeksiyonlara karşı konak savunmasında önemli bir rol oynayan Tip I IFN'ye benzer biyolojik etkiler gösterirler (Abbas, Lichtman ve Pillai, 2019; Ank ve diğerleri, 2006; Roberts, 2015).

IFN- γ (İnterferon gama)

Tip II interferon olarak da bilinen IFN- γ , CD4 Th1, CD8, gama-delta T ($\gamma\delta$ T) ve NK hücreleri tarafından salgılanan bir pleiotropik sitokindir. Bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve enfeksiyöz hastalıkların kontrolünü sağlamakla görevlidir (Lee ve Ashkar, 2018). Bu Th1 sitokin, hem doğal/innate hem de adaptif/kazanılmış bağışıklık yanıtında önemli bir rol oynar (Schoenborn ve Wilson, 2007). Makrofajları uyarak fagosite edilen mikropların öldürülmesini sağlamak ve fagosit kompleman reseptörlerine bağlanarak kompleman proteinlerini üretimini tetikleyerek hücre içi mikropların öldürülmesinde rol almak IFN- γ 'nın immünolojik işlevini yerine getirdiği mekanizmalardır (Abbas ve diğerleri, 2019).

Kemokinler

Kemokinler, enfeksiyon, inflamasyon, hematopoez, anjiyogenez, embriyogenez, lenfoid gelişim gibi çok çeşitli bağlamlarda lökosit migrasyonunun ve fonksiyonunun düzenlenmesi için önemli olan küçük kemotaktik sitokinlerin (8-15 kDa) büyük bir ailesidir (Ramesh ve diğerleri, 2013; Tokunaga ve diğerleri, 2018). Kemokinler, lökosit migrasyonunu düzenleyen, lökosit degranülasyonu ve anjiyogenez gibi süreçlerin oluşmasında yardımcı olan heparin bağlayıcı proteinlerdir. Kemokinler, T ve B hücre matürasyonunda, immün sürveyansda, tolerans oluşumunda, T-B hücre etkileşiminde ve primer immün yanıtın oluşmasında etkindirler (Griffith, Sokol ve Luster, 2014). Ayrıca, T hücrelerin farklılaşmasında ve fonksiyonlarını yerine getirmelerinde, dendritik hücrelerin fonksiyon göstermelerinde, efektör T hücre cevabı oluşmasında, inflamatuvar hastalıklarda ve mukozal immünitede rol oynamaktadırlar (Hughes ve Nibbs, 2018; Strazza ve Mor, 2017).

Kemokinler, birincil amino asit dizileri ve olgun protein içerisinde yapısal olarak sistein rezidülerinin düzenlenmesi ile sınıflandırılır. Bu düzenlenme sonucunda kemokin monomerinin yapısını koruyan disülfid bağları oluşturulur, bunlar merkezi üç şeritli beta (β) tabakası, üstteki bir C-terminal alfa (α) sarmalı ve reseptör aktivasyonunda kritik bir rol oynayan kısa N terminalinden oluşmaktadır. N terminaline en yakın iki sisteinin konfigürasyonuna göre kemokinler CC, CXC, CX3C ve XC olmak üzere dört alt aileye ayrılmaktadırlar (Hughes ve Nibbs, 2018). CC

kemokinlerinde, bu sisteinler doğrudan yan yana yerleştirilirken, CXC kemokinleri arasında tek bir değişken amino asit bulunmaktadır. Tek CX3C kemokinin bu iki sistein arasında üç amino asidi bulunurken, insanlarda iki ve farelerde bir tane olan XC kemokinleri, motifin birinci ve üçüncü sisteinlerinden yoksundur (Nakano ve Gunn, 2001; Nomiya, Osada ve Yoshie, 2013). Kemokinler başlangıçta belirli işlevlere göre isimlendirilse de, 2000 yılında “ligand” anlamı taşıyan L harfi ile kemokin geninin tanımlandığı zamana göre bir sayı ile (Örn: CXCL10) tanımlandılar (Murphy ve diğerleri, 2000; Zlotnik ve Yoshie, 2000).

IFN- γ ve TNF- α gibi proinflatuar sitokinler tarafından inflamasyon ortamında artış gösteren kemokinlerin, kemokin reseptörleri ile etkileşerek lenfositleri doğrudan kendilerine çektikleri düşünülmektedir (Strazza ve Mor, 2017). T lenfositleri üzerinde etkili olduğu gösterilen CXC kemokinleri, İnterlökin-8 (IL-8), “Stromal cell-derived factor 1” (Stromal hücre-türevi faktör 1) (SDF-1), MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11’dir. Bu kemokinler arasında SDF-1, T hücrelerinin farklı alt tipleri için geniş özgüllük gösterirken, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11’in bellek veya İnterlökin-2 (IL-2) ile aktive edilmiş T hücreleri için seçici olarak kemotaktik olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, bu üç kemokinin inflamasyonda T hücreleri üzerinde önemli olduğu düşünülmektedir. Sistematik isimlendirmede kemokin ligand 12 (CXCL12) olarak da bilinen SDF-1, kemokin reseptör 4 (CXCR4) ve kemokin reseptör 7 (CXCR7) adı verilen iki adet reseptöre sahiptir (Konrad, Meichssner, Bury, Ngamsri ve Reutershan, 2017). CXCR3 reseptörü ise MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11 için T hücreleri üzerindeki tek reseptördür (Palomino ve Marti, 2015).

MIG/CXCL9 (Monocyte induced by gamma interferon)

Kemokinlerin CXC ailesinin bir üyesi olan MIG/CXCL9, aktif T-hücrelerinin enfeksiyon bölgelerine göçünde önemli rolü olan bir inflammatuar kemokindir. MIG/CXCL9, Th1 ve Th2 polarizasyonunu artırır, Th1’lerin migrasyonunu desteklerken, Th2’lerin migrasyonunu inhibe eder. MIG/CXCL9 ile IFN- γ ’nın fonksiyonel olarak önemli olmasının nedeni, IFN- γ sinyali ile indüklenme sonrasında MIG/CXCL9 üretiminin gerçekleşmiş olmasıdır (Metzemaekers, Vanheule, Janssens, Struyf ve Proost, 2018; Tokunaga ve diğerleri, 2018). MIG/CXCL9

makrofajlar, monositler, nötrofiller, antijen sunan hücreler (ASH), B hücreleri ve eozinofiller tarafından salgılanmaktadır (Whiting ve diğerleri, 2004). Hatta CD14+ monosit/makrofajların da MIG/CXCL9 salgılayan hücreler üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (Brice, Graber, Hoffman ve Doolan, 2001; Loetscher ve diğerleri, 2001).

IP-10/CXCL10 (Interferon gamma induced protein-10)

IP-10/CXCL10, ilk olarak 1985 yılında Luster ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve IFN- γ 'nın tetiklediği lenfoma hücrelerinde ekspresyonu keşfedilmiş 8.7 kDa ağırlığında bir proteindir. Endotelial hücreler, fibroblastlar, monositler, nötrofiller, dendritik hücreler, mezenkimal hücreler, keratinositler, astrosit gibi çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanabilen IP-10, IFN- γ , IFN- α/β , IL-1 β veya TNF'ye yanıt olarak indüklenebilir (Fallahi ve diğerleri, 2017).

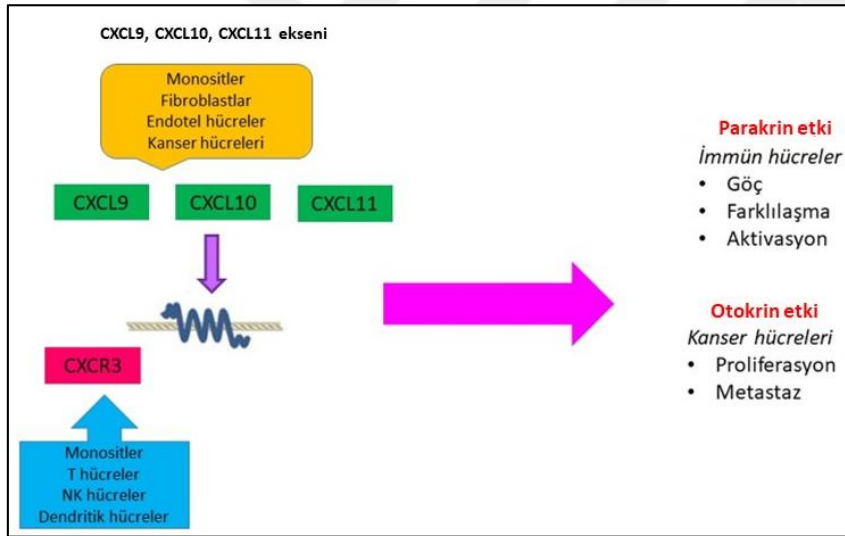
ITAC/CXCL11 (Interferon- inducible T-cell alpha chemoattractant)

I-TAC/CXCL11, IP-10/CXCL10 ve MIG/CXCL9 ile benzer homoloji gösteren bir kemokindir. I-TAC/CXCL11 timus, dalak ve pankreas dokularında eksprese edilir. Reseptörü IP-10/CXCL10 ve MIG/CXCL9 kemokinlerinde olduğu gibi CXCR3'tür. I-TAC/CXCL11, IP-10/CXCL10 ve MIG/CXCL9 artışı organ reddi, otoimmün durumlar, romatoid artrit, inflamatuvar barsak hastalıkları ve hava yolu inflamasyonu gibi birçok T hücre aracılı durumlarla ilişkilendirilmiştir (Loetscher ve diğerleri, 2001; Petkovic, Moghini, Paoletti, Uguccioni ve Gerber, 2004). I-TAC/CXCL11 için bağlanma afinitesinin IP-10/CXCL10 ve MIG/CXCL9'dan çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu kemokinlerin üçü de CXCR3 aktive/bellek T lenfositleri için bilinen ligandlardır. I-TAC/CXCL11 mesajcı RNA (mRNA)'nın IFN- γ ile uyarılmış astrositler, monositler, bronşiyal epitel hücreleri, nötrofiller ve keratinositlerde arttığı bulunmuştur. Ek olarak, I-TAC/CXCL11'in IFN- γ ile uyarılmış insan endotelial hücrelerinde arttığı gösterilmiştir, bu da T lenfositlerin bu kemokinin inflamasyon bölgelerine göçünü düşündürmektedir. Tüm bu bilgilere rağmen I-TAC/CXCL11'in patofizyolojik rolü tam olarak anlaşılamamıştır (Petkovic ve diğerleri, 2004).

SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1)

CXC kemokin ailesinin bir üyesi olan ve sistematik isimlendirmede CXCL12 olarak bilinen SDF-1 lökositlerin göçünden, mezenkimal ve hematopoietik kök hücrelerin mobilizasyonlarından sorumlu bir kemokindir. Kemik iliğinden eksprese edilen SDF-1, CXCR4 ve CXCR7 olmak üzere iki farklı reseptöre sahiptir (Lau ve Wang, 2011). SDF-1, ayrıca MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11'in ligandı olan CXCR3 ile de sinerji içerisinde çalışmaktadır (Yung ve Farber, 2013).

MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve CXCR3 eksenini, naif T hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasını düzenlediği ve hücrelerin odak bölgelerine göç etmesine yol açtığı için önemli bir araştırma odağı olmuştur (Şekil 2.16) (Tokunaga ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.16. İmmün yanıtta MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11 ekseninin önemi (Tokunaga ve diğerleri, 2018)

MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11, glutamik asit (Glu)- lösin (Leu)- arginin (Arg) içermeyen kemokinlerdir. Amino asit dizisi benzerliklerinden dolayı birbirlerine diğer kemokinlerden daha yakındırlar (Clark-Lewis, Mattioli, Gong ve Loetscher, 2003). MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11 geni 4q21.21 kromozomu üzerinde bulunur (Zlotnik ve Yoshie, 2000). Son yıllarda yapılan çalışmalar ve literatürler incelendiğinde kemokinlerin ve reseptörlerinin MSS'de rol oynayabileceği gösterilmektedir. Glial hücreler ve nöronlar MSS'de bulunmalarından dolayı, hücre içi etkileşimde yer alırlar ve çeşitli MSS

hastalıklarının patogenezinde önemli bir rol oynamaktadırlar (Banisadr, Rostène, Kitabgi ve Parsadaniantz, 2005; Koper, Kaminska, Sawicki ve Kemona, 2018; Ramesh ve diğerleri, 2013). MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11, özellikle Th1 yanıtına katılmaktadır. Ayrıca herhangi bir enfeksiyon, inflamatuvar yanıt veya yaralanma durumunda bu üç kemokin IFN- γ ile indüklenerek kan ve doku hücreleri tarafından üretilmektedirler (Koper ve diğerleri, 2018).

Literatürdeki veriler, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11'in MSS'deki reseptörler için hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Örneğin, I-TAC/CXCL11 başlangıçta IFN- β ile tedavi edilmiş fare astrositlerinde tanımlanmıştır. Daha sonra IFN- γ 'nın tek başına veya IL-1 ile birlikte insan astrositleri ve fetal insan mikrogliya hücreleri ile I-TAC/CXCL11 gen ekspresyonunu uyarma kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde IP-10/CXCL10'un da astrosit ve mikrogliya hücreleri üzerinde etki gösterdiği tanımlanmıştır (McColl ve diğerleri, 2004; Michlmayr ve McKimmie, 2014). CXCR3 ile IP-10/CXCL10 sinyali mikroglialar ve nöronal onarım için oldukça büyük bir öneme sahiptir. MIG/CXCL9 ise yapısal olarak insan beyni türevli mikrovasküler endotel hücreleri ve astrositler üzerinde eksprese edilmektedir (Li ve diğerleri, 2006; Müller, Carter, Hofer ve Campbell, 2010).

MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11'in MS, Alzheimer, kene kaynaklı ensefalit (TBE) ve LNB gibi MSS'nin seçilmiş hastalıklarında CXCR3 ile birlikte rol oynadığı düşünülmektedir (Koper ve diğerleri, 2018; Müllegger ve diğerleri, 2007). Özellikle son yıllarda CXCR3'ün nörolojik hastalıklar üzerindeki rolü tartışılmaya başlanmıştır. CXCR3'ün MS, glioma, bipolar bozukluklar, kronik ağrı patogenezinde hayati bir rol oynadığı hatta nöroinflamatuvar ve nörodejeneratif hastalıklar için kritik bir molekül olduğu bilinmektedir. Bununla beraber ensefalomiyelit, menenjit ve nöroborelyoz hastalarının serum ve BOS gibi vücut sıvılarında kemokinlerin tanıda kullanılabilecek yararlı belirteçler olması kemokinler üzerinde çalışılmasını ilgi çekiçi hale getirmiştir (Maric ve diğerleri, 2018; Zhou ve diğerleri, 2019).

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamız Lyme hastalığının farklı klinik tutulumlarına (ECM, LA, LNB) sahip bireylerden elde edilen mononükleer hücrelerde tanıda

yararlı belirteç olabileceği düşünölen kemokinlerin tespit edilmesine olanak sağlayarak olguların ileri dönemlere ulaşmadan fark edilebilmesine destek olacaktır.

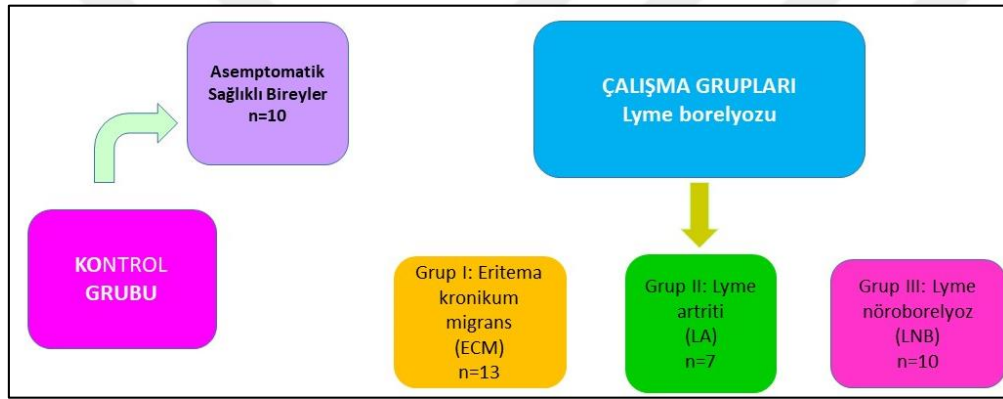


3. YÖNTEM

3.1. Araç-Gereçler

3.1.1. Çalışma grupları

Bu tez çalışması için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Klinik Araştırmalar ve Etik Kurulu'ndan 2019-77 (EK-1) karar numarası ile izin alınmıştır. Araştırmamızın çalışma grupları olgu ve kontrol grubu olarak iki bölüme ayrılmıştır. Olgu grubumuz ise kendi içerisinde üç farklı gruba bölünmüştür. Bu gruplar Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmaya dahil edilen gruplar

Çalışmamıza dahil edilen olgu sayısı, yaş aralığı ve cinsiyet dağılımı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmamıza dahil edilen olguların ve kontrol grubunun demografik özellikleri

Çalışma grupları ve olgu sayıları		Yaş Ortalama ± Standart sapma	Cinsiyet Erkek Sayı (%)	Kadın Sayı (%)
Eritema kronikum migrans (ECM)	(n=13)	44,77 ± 17,5	7 (53,8)	6 (46,2)
Lyme artriti (LA)	(n=7)	45,86 ± 17,1	2 (28,6)	5 (71,4)
Lyme nöroborelyoz (LNB)	(n=10)	37,9 ± 13,4	4 (40)	6 (60)
Sağlıklı kontrol	(n=10)	42,2 ± 11,05	5 (50)	5 (50)

Çalışmamıza Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji ve Enfeksiyon Hastalıkları polikliniklerine Lyme düşündürülen belirti ve/veya bulgularla başvuran Lyme tanısı almış ve Bilgilendirilmiş Olur Formu (EK-2) ile onamı alınan olgular ile asemptomatik sağlıklı bireyler olmak üzere toplam 40 birey (30 Lyme

borelyoz 10 kontrol) dahil edildi. Çalışmaya dahil edilecek bireyler seçilmeden önce planlanan n= 30 olgu sayısına ulaşılabilmesi için başlangıçta 54 Lyme borelyoz tanılı olgunun serum örneklerinde optimum koşullar sağlanarak (ortam sıcaklığı vs.) Borrelia rekombinant IgG ve Borrelia rekombinant IgM ELİSA (Novatec Immundiagnostica, Almanya) testleri firma önerileri doğrultusunda çalışıldı. Olguların semptom gösterme durumları, klinik tutulumları (ECM, LA, LNB), antibiyotik kullanımı, laboratuvar değerleri ve ELİSA test sonuçları değerlendirildi. Serum örneği toplanan 54 olgu klinik tutulumlarına göre sınıflandırıldı. Bulguları değerlendirilen 54 olgunun 30'una (13 ECM, 7 LA, 10 LNB) ait serum örneklerine (hem ELİSA testlerinin sonucunda elde edilen değerlere göre hem de antibiyotik kullanmayan, sifiliz testi negatif ve klinik semptom gösteren) ELİSA test sonucu negatif dahi olsa doğrulama yapılması için recomline Borrelia WB (Mikrogen, Neuried, Germany) testi de uygulandı.

Çalışmaya dahil edilen bu olguların 30'u çalışmanın olgu grubunu oluşturan Lyme hastaları, 10'u sağlıklı kontrol grubundan oluşmakta idi. Şekil 3.1'de belirtildiği gibi Lyme olguları ECM (6 Kadın, 7 Erkek, ort yaş $44,77 \pm 17,5$ yıl), LA (5 Kadın, 2 Erkek, ort yaş $45,86 \pm 17,1$), LNB (6 Kadın, 4 Erkek, ort yaş $37,9 \pm 13,4$) olgularından oluşmaktadır. Sağlıklı kontrol grubu olan bireyler ise 10 gönüllüden (5 Kadın, 5 Erkek, ort yaş $42,2 \pm 11,05$ yıl) oluşmaktadır. Sağlıklı kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilen bireylerin kene temaslarının olmaması, Lyme testlerinin/serolojilerinin (ELİSA ve WB) negatif olmasına ve Lyme yönünden herhangi bir semptom göstermemelerine özellikle dikkat edildi. Olgularda hastalık tanımlanırken CDC tarafından önerilen puanlama sistemi dikkate alındı (Centers for Disease Control and Prevention, 2021; Sirmatel ve diğerleri, 2015).

Bu puanlamaya göre

Olgularda ECM görülmesi ve uzman hekim tarafından doğrulanmış olma (7 puan), endemik bölgede kene ile temas etme (1 puan), Borrelia yönünden IgG/IgM seropozitifliği (3 puan) gibi puanlamaların skorlarına bakıldığında ≥ 4 Lyme borelyoz olabilir, $\geq 5-6$ Lyme borelyoz olması mümkündür, ≥ 7 ise Lyme borelyoz yönünden kuvvetli pozitif olarak değerlendirildi. Hasta seçiminde Lyme borelyoz yönünden kuvvetli pozitif (puan > 7) olan olgular çalışmaya alındı.

Çalışmaya dahil edilecek olguların belirlenmesi için çalışılan Borrelia IgG/IgM ELİSA ve recomline Borrelia WB test prosedürü

Borrelia burgdorferi IgG/IgM ELİSA kiti

- Çalışmaya başlamadan önce kitler ve olgulara ait serum örnekleri oda sıcaklığına getirildi.
- Oda sıcaklığına ulaşan örnekler homojen bir karışım olması için vortekslendi.
- Çalışma sırasında kullanılacak olan yıkama solüsyonu 20X konsantre olduğu için 1/20 oranında distile su kullanılarak dilue edildi.
- Kit içerisinde yer alan örnek dilüsyon solüsyonu (sample diluent) (1 ml) kullanılarak serum (10 µl) örnekleri 1:101 oranında dilüe edildi.
- Kuyucuklara sırasıyla dilüe edilen örnekler, pozitif, negatif ve cut off kontroller 100'er µl pipetlendi.
- Kuyucukların üzeri seal bant ile kapatılarak 37° C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon tamamlandıktan sonra seal bant dikkatlice uzaklaştırıldı ve istenmeyen bağlanmaların arındırılması için daha önceden hazırlanmış yıkama solüsyonu ile tüm kuyucuklar 3 kere (3x300 µl) 300 µl yıkandı.
- Yıkamanın ardından substrat blank için ayrılmış kuyucuklar hariç tüm kuyucuklara 100 µl konjugat pipetlendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon bitiminde yıkama işlemi tekrarlandı.
- Tüm kuyucuklara 100 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika üstü kapatılarak karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda reaksiyonun sonlandırılması için tüm kuyucuklara 100 µl stop solüsyon eklendi ve 30 dakika içerisinde plak 450 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazına okutularak absorbens değerleri belirlendi.
- Testin geçerliliği için olması gereken değerler* kontroller için elde edilen absorbens değerlerine göre belirlenerek olgulara ait absorbens değerleri aşağıda yer alan formüle göre değerlendirildi.

*Substrate blank: Absorbance value <0.100

Negative control: Absorbance value <0.200- <Cut-off

Cut-off control: Absorbance value 0.150-1.300

Positive control: Absorbance value > Cut-off

NOT: Kontrol değerleri için ikişer kuyucuk kullanılarak kuyucukların ortalaması alınarak hesaplamalar yapıldı.

Sample (mean) absorbance value x 10 = Results

Cut-off

Örnek: $0,727 \times 10 = 6,85$

1, 0615

NTU değerlerine göre hesaplama yapıldıktan sonra sonuçların değerlendirilmesi için kullanılan kriterler:

- Pozitif: >11 NTU
- Greyzon/şüpheli: 9-11 NTU
- Negatif: <9 NTU

Borrelia burgdorferi IgG/IgM Western blot kiti

Doğrulama testi olarak kullanılan immunblot testi recomLine *B.burgdorferi* IgG/IgM WB (Mikrogen, Neuried, Germany) kullanılarak firma önerileri doğrultusunda çalışıldı.

- ✓ çalışmaya başlamadan önce kit içeriğinde saflaştırılmış antijenler ile kaplanmış test şeritleri/stripleri bulunan kitler ve serum örnekleri oda sıcaklığına getirildi.
- ✓ Konsantre halde olan yıkama solüsyonu hazırlandı.
- ✓ çalışma esnasında kullanılacak olan konjugat solüsyonu konjugat inkübasyonundan hemen önce çalışılacak olgu sayısına göre hesaplanarak hazırlandı. Dilüe edilen yıkama solüsyonu kullanılarak hazırlanan konjugat solüsyonundan artan miktarın stoklanmamasına dikkat edildi.
- ✓ Test esnasında kullanılacak antijen içerikli test şeritleri/stripleri firma tarafından gönderilen inkübasyon traylerine forseps yardımı ile (antijenlerin zedelenmemesi için elle dokunulmadan) yerleştirildi.
- ✓ Üzerlerine kullanıma hazır olan dilüsyon solüsyonundan 2 ml eklendi ve çalkalayıcı sayesinde test şeritlerinin/striplerin tamamen ıslanması sağlandı.

- ✓ Islatılan test şeritleri/stripleri üzerine IgG için 20 µl, IgM için ise 40 µl serum örnekleri pipetlendi.
- ✓ İnkübasyon traylerinin kapakları kapatılarak çalkalayıcıda 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyon sonunda traylerin içerisinde yer alan test şeritleri/stripleri 3'er kez 5'er dakika 2 ml yıkama solüsyonu pipetlenerek şeritlere solüsyonunu tamamının ulaşabilmesi için çalkalayıcı yardımı ile yıkandı.
- ✓ Yıkama işleminin ardından test şeritleri/stripleri üzerine kullanıma hazır hale getirilen konjugat solüsyonu (IgG için IgG konjugat, IgM için IgM konjugat) 2 ml olarak pipetlendi ve traylerin üzerleri kapatılarak 45 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Süre sonunda yıkama işlemi tekrar edildi (3 kez 5'er dakika).
- ✓ Yıkama işlemi sonrası test şeritleri/stripleri üzerine 1.5 ml substrat solüsyonu eklendi ve yine çalkalayıcıda 8 dakika inkübe edildi.
- ✓ Substrat solüsyonunun uzaklaştırılması için test şeritleri/stripleri en az 3 kez distile su ile yıkandı.
- ✓ Test şeritleri/stripleri forseps yardımı ile traylerden uzaklaştırılarak kurutma kağıtları üzerine yerleştirildi ve kurumaları bekledi.
- ✓ Test şeritleri/stripleri kit içerisinde yer alan değerlendirme kağıtlarına göre bakılarak değerlendirildi.

Olgu ve kontrol grubu olarak teze dahil edilecek kişiler çalışmaya dahil edilme ve dahil edilmeme kriterlerine göre belirlendi.

Dahil olma kriterleri

- 1- Olguların çalışmaya katılmaya gönüllü olması
- 2- Kene teması sonrası müracaat eden ve/veya daha önce Lyme tanısı almış olgu olması
- 3- Sağlıklı gönüllülerde kene temas hikâyesinin olmaması
- 4- ELİSA IgG veya IgM testlerinden herhangi birinin pozitif veya Greyzone olması ve/veya WB testi ile doğrulama yapılmış olması (Semptomlar 1 aydan daha kısa süreli ise hem IgM hem de IgG daha uzun süreli ise yalnızca IgG) ***
- 5- ELİSA IgG ve IgM testi negatif olmasına rağmen klinik olarak hastalık tablosu gözlemlenen olgular (WB ile IgG/IgM yönünden test edilecektir) ***
- 6- CDC tarafından kullanılan puanlama sistemine göre klinik gösteren olgular

- 7- Lyme pozitif olarak saptanan olguların henüz *antibiyotik tedavisi almamış olması*
- 8- *B.burgdorferi* WB IgG testinde, CDC verilerinde belirtilen en az 5 bandın, IgM de ise en az 2 bandın pozitif olması ve/veya Avrupa'ya göre değerlendirme yapıldığında ise IgG için ≥ 2 bant, IgM için ise ≥ 1 bant pozitif olması ***

*** Bu kriterler kitler içerisinde farklı genotiplerin olması nedeniyle standartlaştırılamamıştır.

Dışında tutulma kriterleri

- 1- Çalışmaya katılmaya gönüllü olmaması
- 2- Sağlıklı gönüllülerde kene temas hikâyesinin olması
- 3- Lyme hastalığı açısından antibiyotik tedavisi almış olması
- 4- ELİSA IgG ve IgM testinde negatif olarak bulunan örnekler (herhangi bir semptom yok ise WB doğrulamaya gönderilmedi).
- 5- WB testinde IgG ve IgM testleri için Amerika ve/veya Avrupa kriterlerini sağlamaması
- 6- Hemoliz olan örnekler
- 7- Spesifik treponemal antijenler ile çapraz reaksiyon olabileceğinden sifiliz testlerinden "Veneral Disease Research Laboratory" (VDRL) ve *Treponema pallidum* hemagglütinasyon (TPHA) testleri pozitif olan örnekler

Kene teması ve/veya kene ısırması sonrasında polikliniklerimize başvuran, klinik olarak takip edilen ve serolojik yönden pozitif olarak belirlenip Lyme tanısı almış olgulara Burrascano ve Horowitz (Burrascano, 2008; Citera, Freeman ve Horowitz, 2017) kriterleri dikkate alınarak hazırlanan ve Çizelge 3.2'de yer alan "Kene temas formu anketi" uygulandı. Bu anketle birlikte

- Olguların demografik verileri, aile öyküleri,
- Sistemik hastalıklarının olup olmadığı,
- Antibiyotik kullanım durumları,
- Kene tutunma öyküleri ve bölgesi, pikniğe gitme sıklıkları ve
- Lyme hastalığının gösterdiği tüm semptomların olgularda olup olmadığı sorgulandı.

Çizelge 3.2. Kene temas formu anketi

KENE İLE TEMAS HASTA TAKİP FORMU	
Adı soyadı:	
Yaş cins:	İlk başvuru plk:
Mesleği:	Kene ile temas/ısıрма: ☐ Evet ☐ Hayır
TC No:	
Sistemik Hastalık:	
Ailevi özellik:	
Antibiyotik kullanımı:	
Klinik Bulgular:	
Yaşadığı yer: ☐ İl ☐ İlçe ☐ Köy... vs.	
Beslenme şekli? ☐ Ev ☐ Dışardan	
Seyahat öyküsü: ☐ Yurtiçi ☐ Yurtdışı	
Medeni durum ☐ Evet (Evli, Bekar, Boşanmış) ☐ Hayır (Hamilelik durumu)	
Evde hayvan besleme (Özellikle kemirici grubu, sincap vs...) ☐ Evet ☐ Hayır	
Pikniğe gitme sıklığı:	
Sigara/içki kullanımı var mı? ☐ Evet ☐ Hayır	
Laboratuvar bulguları:	
ELİSA IgG:	IgM:
Western IgG:	IgM:
BOS laboratuvar bulguları:	
Gösterdiği semptomlar: • Lenfadenopati • Boğaz ağrısı • Ateş • Boğazda acıma • Eklem ağrısı • Eklemde şişlik • Açıklanamayan bel ağrısı • Eklem sertliği ve sırt ağrısı • Kaslarda ağrı ve kramp • Kaslarda güçsüzlük • Yüz ve kaslarda seğirme • Düşüncelerde zorlanma ve konfüzyon • Yeni bilgi edinmede zorluk, konsantrasyonda zorlanma, okuduğunu anlamakta zorlanma • Konuşma güçlüğü, konuşacağı kelimeyi unutma • İsim ve kelime hatırlamada zorluk • Kısa süreli hafıza kaybı, dikkat azalması • Bulunduğu yeri hatırlamada zorluk • Hecelemede zorluk kelime telaffuzunda yanlışlık • Ruhsal sıkıntı ve sinirlilik • Anksiyete ve panik atak • Halisülasyon, sanrı, paranoya, psikoz • Titreme • Bayılma • Baş ağrısı • Işığa duyarlılık • Seslere duyarlılık • Çift görme, bulanık görme, gözünün önünde uçuşmalar • Kulak ağrısı, kulakta çınlama, işitme azalması • Hareketle artan baş dönmesi • Denge bozukluğu, ayak parmak ucuna basar gibi yürüme • Sersemlik, baş dönmesi ile oturacak yer arama • Uyuşukluk, karıncalanma, yanma, bıçak saplanır gibi ağrı duyma, ciltte aşırı duyarlılık • Yüz felci, Bell's paralizi • Diş ağrısı • Ense sertliği, boyunda çatırdama	

Çizelge 3.2. (devam). Kene temas formu anketi

Gösterdiği semptomlar:

- Yorgunluk, halsizlik, dayanıksızlık
- Uykusuzluk, uykuların bölünmesi, erken uyanma
- Geceleri aşırı uyuma
- Gün boyu uyuklama
- Açıklanamayan kilo alımı/kaybı
- Açıklanamayan saç dökülmesi
- Genital bölgede ağrı
- Mens düzensizliği
- Göğüs ağrısı, süt gelmesi
- Mesane disfonksiyonu
- Ereksiyon kusuru
- Libido kaybı
- Mide bulantısı ve kusma hissinin olması
- Kalp ve mide ağrısı
- Kabızlık
- İshal
- Karnın alt kısmında ağrı ve kramp
- Kalpte üfürüm ve valv prolapsusu
- Kalp çarpıntısı, atma
- EKG üzerinde kalp bloğu ve düzensizlik
- Göğüs ve kaburgalarda ağrı
- Başta dolgunluk
- Açıklanamayan öksürük, nefes darlığı, hava açlığı
- Gece terlemesi

3.1.2. Kullanılan kitleler

Çalışma sırasında kullanılan test kitleleri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışma sırasında kullanılan test kitleleri

No	Test kiti adı	Marka
1	<i>Borrelia burgdorferi</i> rekombinant IgG ELİSA kiti	NovaTec Immunodiagnostica, Almanya
2	<i>Borrelia burgdorferi</i> rekombinant IgM ELİSA kiti	NovaTec Immunodiagnostica, Almanya
3	recomLine <i>Borrelia</i> IgG immünblot kiti	Mikrogen Neuried, Germany
4	recomLine <i>Borrelia</i> IgM immünblot kiti	Mikrogen Neuried, Germany
5	IFN-γ ELİSA kiti	YL biont, Shanghai, Çin
6	MIG/CXCL9 ELİSA kiti	YL biont, Shanghai, Çin
7	IP-10/CXCL10 ELİSA kiti	YL biont, Shanghai, Çin
8	I-TAC/CXCL11 ELİSA kiti	YL biont, Shanghai, Çin

Borrelia burgdorferi rekombinant IgG, IgM ELİSA kiti içerdiği antijenler: *B.burgdorferi* sensu stricto, *B.garinii*, *B.afzelii*, OspC 22kDa (*B.burgdorferi* sensu stricto strain B31), p100 (*B.afzelii*), p18 (*B.afzelii*), 20047 ve T25 (*B.garinii*), Flagellin p41 (*B.garinii*)

recomLine *Borrelia* IgG, IgM immünblot kiti içerdiği antijenler: p100 (*B.afzelii*), VlsE, p58 (*B.garinii*), p41 (*B.burgdorferi* sensu stricto), p39 (*B.afzelii*), OspA (*B.afzelii*), OspC (*B.burgdorferi* sensu stricto, *B.afzelii*, *B.garinii*, *B.spielmanii*), p18 (*B.burgdorferi* sensu stricto, *B.afzelii*, *B.garinii*, *B.spielmanii*, *B.bavariensis*)

3.1.3. Hücre kültürü malzemeleri

Hücre hatları

Çalışmamızda kullanılmak üzere mikroglia hücre hattı Dr. E. Ümit BAĞRIAÇIK (Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji AD, Ankara), monosit hücre hattı ise Dr. Ali ÖZTUNA (Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, Ankara) tarafından armağan edilmiştir.

Çalışmamızda, olgulardan elde edilen monosit hücreleri dışında rekombinant *Borrelia* antijenlerine karşı bazal (baseline) sitokin ve kemokin sekresyon düzeylerini anlayabilmek için HMC3 (ATCC® CRL-3304™) insan mikroglia ve U-937 (ATCC® CRL-1593.2™) insan monosit hücre hatları kullanıldı.

Mikroglia hücre kültürü için %10 “Fetal Bovine Serum” (Fetal sığır serum) FBS, %10, %0,5 antibiyotik içeren “Eagle's Minimum Essential Medium” (EMEM) besiyeri, monosit hücre kültürü için ise %10 FBS, %0,5 antibiyotik içeren “Roswell Park Memorial Institute 1640” (RPMI 1640) besiyeri hazırlandı.

Hücreler %5 CO₂'li ortamda 37°C'de inkübe edildi. Hücrelerin çoğalmasından sonra hücre hatlarına rOspC eklenerek 24-48-72 saatlik inkübasyonlar sonrasında süpernatantlar toplandı.

Kullanılan cihazlar

Çalışmalar sırasında kullanılan cihazlar Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz adı	Marka ve modeli
Buzdolabı	Samsung, Güney Kore
Derin dondurucu (-80°C)	Nüve, DF 490, Türkiye
Distile su cihazı	Kros Medikal, Türkiye
Elektronik hassas terazi	Ohaus, ABD
ELİSA plak okuyucu (Spektrofotometre)	Thermo Scientific, ABD
ELİSA plak yıkayıcısı	ELx50 Biotek Instruments, ABD
İnvert mikroskop	Olympus, ABD
CO ₂ 'li etüv	Nuaire, Nu4750E, ABD
Laminar akımlı steril kabin (Sınıf II)	Bilser, Türkiye
Otomatik hücre sayım cihazı	Bio-Rad TC20, Bio-Rad Laboratories, ABD

Çizelge 3.4. (devam) Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz adı	Marka ve modeli
Otomatik pipet seti (1000, 100, 10 µl)	Thermo scientific, ABD
Soğutmalı santrifüj	Nüve, NF 400R, Türkiye
Sıvı azot tankı	Statebourne biorack 3000, İngiltere
Su banyosu (Benmari)	Electro-mag M96KD, Türkiye
Vorteks	Velp scientifica, İtalya
Çalkalayıcı inkübatör (shaker)	New Brunswick scientific, Excella E24, Germany

Kullanılan sarf malzemeler

Çalışmalar sırasında kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Malzeme adı	Marka
Cryo (kriyo) vial (2 ml)	Isolab, Türkiye
Eppendorf tüp (1,5 ml)	Eppendorf, Almanya
Hemogram tüpü	BD, ABD
Hücre kültür plakları (24, 48, 96)	TPP, İsviçre
Hücre kültürü flasks (25-75 cm ²)	Corning, Meksika
Falkon tüpü (15 ml)	MTC Bio, ABD
Falkon tüpü (50 ml)	MTC Bio, ABD
Jelli kan alma tüpü	BD, ABD
Steril pastör pipeti	LP Italiana SPA, İtalya
Steril pipet ucu (10 µL)	Axygen, ABD
Steril pipet ucu (100 µL)	Axygen, ABD
Steril pipet ucu (1000 µL)	Axygen, ABD

Kullanılan kimyasallar

Çalışmalar sırasında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar

Malzeme adı	Marka
<i>Borrelia burgdorferi</i> rOspC	MyBioSource, ABD
Dimetil sulfoksit (DMSO)	PanReac AppliChem, ABD
EMEM	Biological Industries, İsrail
FBS	Sigma-Aldrich, ABD
Ficoll-hypaque	Merck, ABD
Fosfat tamponlu solüsyon (PBS)	PAN Biotech, Almanya
Penicillin-Streptomycin Solution	Sigma-Aldrich, ABD
RPMI 1640	Biological Industries, İsrail
Tripan Mavisi	Bio-rad Laboratories, ABD
Tripsin/EDTA	Sigma-Aldrich, ABD

3.2. Çalışmanın Aşamaları

3.2.1. Örneklerin toplanması

Bu çalışma için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 2019-77 sayı ile alınan Etik kurul onayı Ekler bölümünde Ek-1'de sunulmuştur.

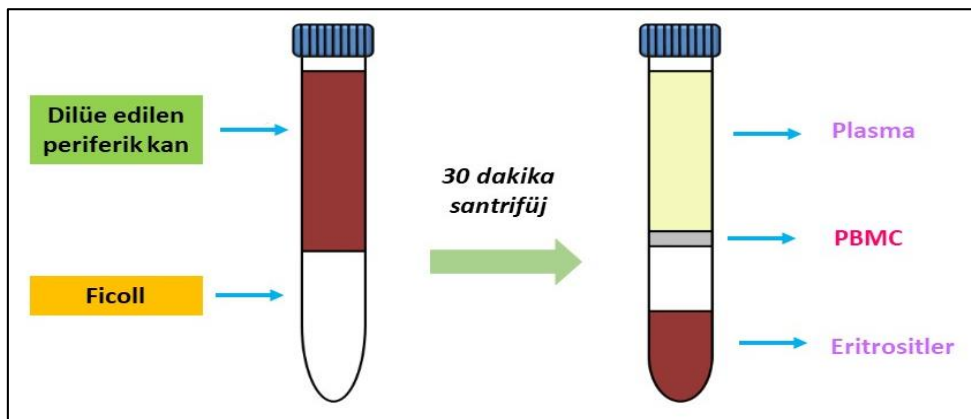
Etik kurul onayının alınmasının ardından gönüllü onam formu imzalayan her bir gönüllü ve hastadan *Borrelia* testleri için 1 adet jelli kan alma tüpüne 5-8 ml kan alındı. Alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendiren serum örnekleri elde edildi. Hücre kültürü ile periferik mononükleer hücrelerin elde edilmesi için 10 ml'lik EDTA'lı hemogram tüpüne kan örneği alındı. Sitokin ve kemokinlerin çalışılması için hücre kültüründen elde edilen süpernatant örnekleri kullanıldı.

3.2.2. Alınan örneklerden periferik kan mononükleer hücrelerinin ayrılması ve hücrelerin dondurulma aşaması

Periferik kan mononükleer hücrelerinin ayrılması*

- Örneklerden PBMC elde edilmesinin tüm aşamaları hücre kültürü çalışmalarında olduğu gibi Biyogüvenlik Sınıf II kabini içerisinde aseptik koşullarda yapıldı.
- Çalışmaya dahil edilecek olgular ve gönüllülerden alınan kan örneği, 50 ml'lik steril, konik tabanlı polipropilen tüp (falkon tüp) içerisine aktarıldı.
- Tüp içerisindeki kan örneği 10 ml %0,9'luk izotonik serum fizyolojik (SF) ile yavaşça alt üst edilerek eşit oranda (1:1) dilüe edildi.
- Başka bir falkon tüpü içerisine sulandırılmış kan örneğinin yaklaşık üçte biri kadar Ficoll medyum konuldu.
- Ficoll medyumun üzerine 45°'lik açı ile yavaşça dilüe edilen kan örneği eklendi ve 400 x g'de (1500 rpm) 30-40 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında steril pastör pipeti yardımı ile önce en üst tabakadaki plasma toplandı (Şekil 3.2).
- Ardından "*buffy coat*" olarak adlandırılan bulutumsu tabaka steril pipet yardımı ile yeni bir falkon tüpüne aktarıldı.

- Falcon tüpü içindeki “*buffy coat*” üzerine PBS eklenerek 800 x g’de (2000 rpm) 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında dikkatli bir şekilde süpernatant döküldü. Kalan pellet homojenize edilerek yeniden PBS eklenerek 700 x g’de (1800 rpm) 10 dakika daha santrifüj edildi. Yine süpernatant döküldü ve kalan pellet homojenize edildi.
- Bu işlemler sayesinde hücrelerin yıkanması sağlandı.
- %10’luk FBS içeren RPMI-1640 besiyeri homojenize edilen pellet üzerine 5 ml olacak şekilde eklenerek steril flaska aktarıldı.
- Flaskalar %5 CO₂’li, etüvde 90 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından flaskadaki tüm hücreler besiyeri ile beraber steril yeni bir falkon tüpüne aktarıldı ve 400 x g’de (1500 rpm) 15 dakika daha santrifüj edildi.
- Süpernatant dikkatlice döküldükten sonra besiyeri ile homojenize edilen pelletten 10 µl örnek alınarak Tripan mavisini ile karıştırıldı.
- Tripan mavisini ile karıştırılan hücreler özel slaytlara pipetlenerek otomatik hücre sayım cihazı (*Automated Cell Counter TC20, Bio-Rad, ABD*) kullanılarak mililitredeki hücre sayısı tespit edildi.
- Kalan pellet için %10’luk DMSO solüsyonu içeren “freezing medium” dondurma medyumunu hazırlanarak örnekler cryoviallere dağıtıldı.
- Cryo vial içerisindeki örnekler çalışma zamanı gelinceye kadar -80°C’de saklandı.



Şekil 3.2. Periferik kandan mononükleer hücre (PBMC) eldesi

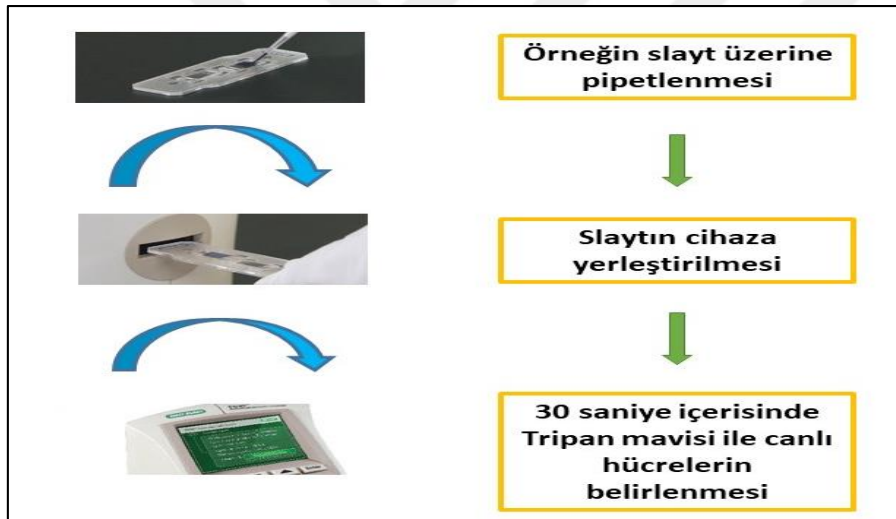
3.2.3. Çalışma öncesi dondurulan hücrelerin hazırlanma aşaması

Daha önceden cryo viallerde dondurulmuş hücreler -80°C’den çıkarıldıktan sonra 37°C’ye ayarlanmış su banyosu içerisinde dikkatli bir şekilde çözündürüldü. Önceden

hazır edilmiş %10'luk FBS içeren RPMI-1640 besiyerinden 9 ml alınarak falkon içerisine konuldu. Üzerine çözdürülen cryo vial içerisindeki hücreler eklendi ve 400 x g'de (1500 rpm) 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant döküldü. Pellet dikkatlice %10'luk FBS içeren RPMI-1640 besiyeri ile homojenize edildi.

3.2.4. Hücre kültürü ekimi için hücre sayımının yapılması

Homojenize edilen örnekten 10 µl alınarak Tripan mavisi ile karıştırılarak Thoma lamında birkaç örnek test edildi ve ardından otomatik hücre sayım cihazı ile hücreler sayıldı (Şekil 3.3). Tripan mavisi ile hücrelerin canlılığı değerlendirilerek %90 oranında canlı hücre içeren örnekler çalışmamıza dahil edildi.



Şekil 3.3. Otomatize hücre sayım prosedürü

3.2.5. PBMC'lerin kültüre edilmesi, hücrelerin proliferasyonu ve süpernatantların toplanması

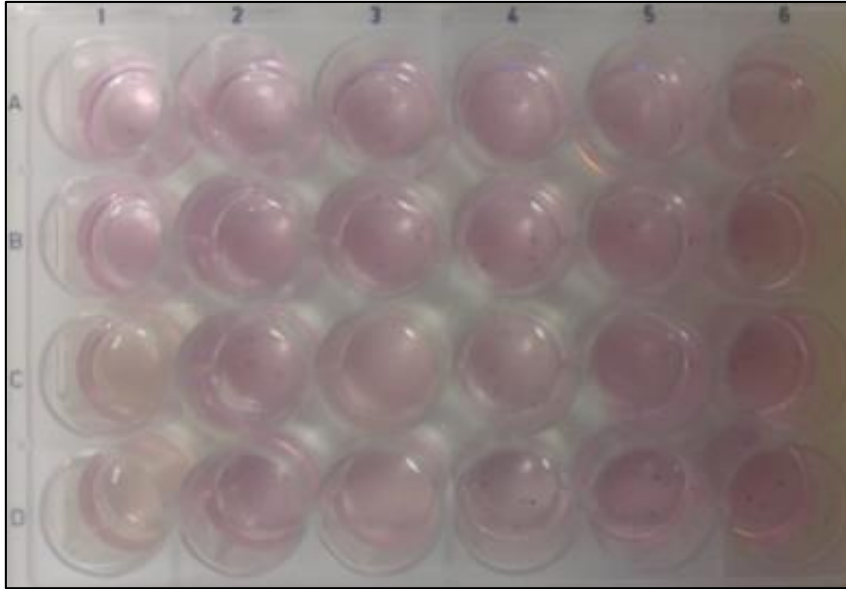
PBMC'ler, %10 FBS eklenmiş RPMI 1640 ortamı kullanılarak 24 kuyucuklu plaklara ekildi ve %5 CO₂'lik etüvde 37° C'de inkübe edildi. PBMC'ler, herhangi bir uyarıcı olmadan çoğalma özelliği gösteremedikleri için 24 kuyucuklu bir plak içerisine 200 µL'lik toplam hacimde 0.5-2 x 10⁵ hücre/mL yoğunluğunda kaplandı. Ekimi yapılan 24 kuyucuklu hücre plağının olgular ve kontrollere göre yapılmış şeması Çizelge 3.7'de görüntüsü ise Resim 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Olguların (ECM/LA/LNB) 24 kuyucuklu plak şeması

ECM/LA/LNB Örnek 1	ECM/LA/LNB Örnek 3	ECM/LA/LNB Örnek 5	ECM/LA/LNB Örnek 7	ECM/LA/LNB Örnek 9	ECM/LA/LNB Örnek 11
ECM/LA/LNB Örnek 1	ECM/LA/LNB Örnek 3	ECM/LA/LNB Örnek 5	ECM/LA/LNB Örnek 7	ECM/LA/LNB Örnek 9	ECM/LA/LNB Örnek 11
ECM/LA/LNB Örnek 2	ECM/LA/LNB Örnek 4	ECM/LA/LNB Örnek 6	ECM/LA/LNB Örnek 8	ECM/LA/LNB Örnek 10	ECM/LA/LNB Örnek 12
ECM/LA/LNB Örnek 2	ECM/LA/LNB Örnek 4	ECM/LA/LNB Örnek 6	ECM/LA/LNB Örnek 8	ECM/LA/LNB Örnek 10	ECM/LA/LNB Örnek 12

ECM: Eritema kronikum migrans, LA: Lyme artrit, LNB: Lyme nöroborelyoz

Her bir örnek yedek olabilmesi için 2 adet kuyucuğa ekilmiştir. Olgu ve kontrol grubu için ayrı ayrı 24'lük kuyucuklu plaklara ekim yapılmıştır.



Resim 3.1. ECM/LA/LNB grubu plak şeması (24 saatlik inkübasyon için)

3.3. Çalışma Planı

Ekimleri 24 kuyucuklu plaklara yapılan örneklerin uyarılması için rOspC firmanın önerdiği biçimde çözündürülerek hazır edildi. Olgulardan elde edilen monositler dışında pozitif kontrol olarak kullanılan monosit ve mikroglia hücre hatları da çoğaltılarak 24 kuyucuklu plaklara ekildi. Daha sonra hücrelere aynı konsantrasyonlarda rOspC eklenerek 24-48-72 saatlik inkübasyon gerçekleştirildi. Her inkübasyon süresi sonrasında aynı saatlerde süpernatantlar toplandı.

3.3.1. Hücre kültüründen elde edilen süpernatant örneklerinde sitokin ve kemokinlerin ölçümü

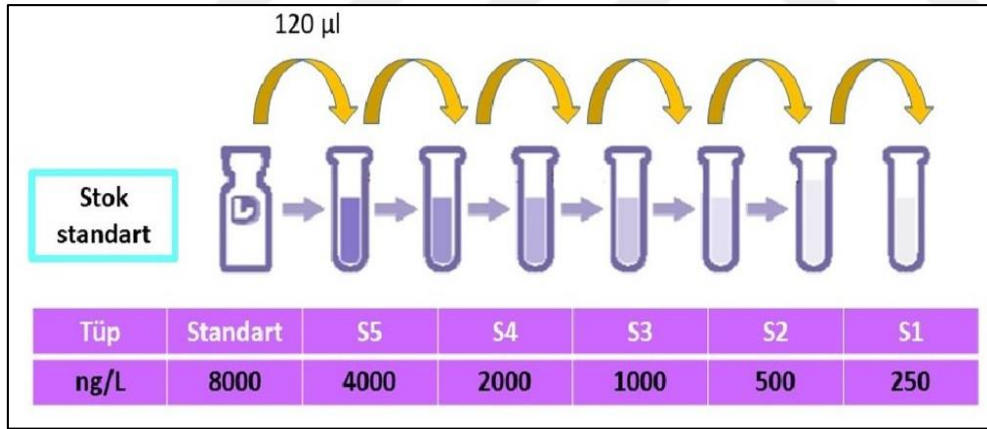
Çalışmamızda MIG/CXCL9, IP10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ , düzeylerinin ölçümü için kullanıma hazır ticari ELİSA kitleri alınmıştır. Test kitleri firma önerileri doğrultusunda çalışılmıştır.

MIG/CXCL9, IP10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ ölçümü

MIG/CXCL9, IP10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ , ELİSA kiti

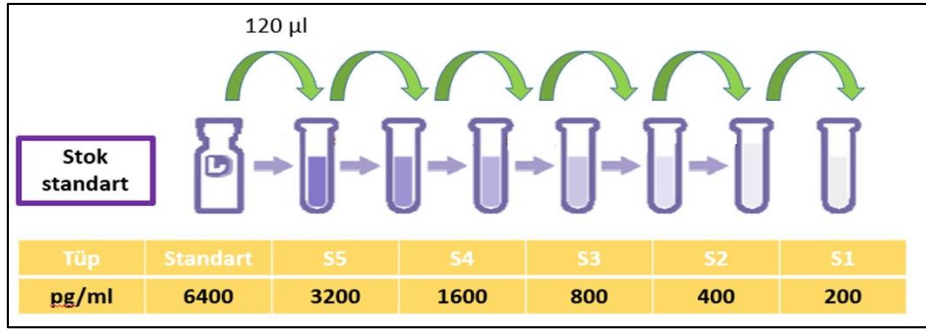
- ✓ Çalışmaya başlamadan önce kitler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi.
- ✓ Oda sıcaklığına getirilen örnekler homojen bir karışım olması için vortekslendi.
- ✓ Çalışma sırasında kullanılacak olan yıkama solüsyonu 30X konsantre olduğu için 1/30 oranında distile su ile dilue edildi.
- ✓ Standartların dilüsyonu için 6 adet ependorf/dilüsyon tüpü alındı.
- ✓ Birinci tüpe 120 μ L orijinal standart (kitin içerisinde bulunan) ve 120 μ L standart dilüsyon solüsyonu eklendi.
- ✓ Diğer 5 tüpe de 120 μ L standart dilüsyon solüsyonu eklendi.
- ✓ MIG/CXCL9, IP10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ , kitlerinin içinden çıkan stok standartların hazırlığı için sırasıyla ilk tüpten ikincisine 120 μ L dilüe edilen standartlar alındı pipetaj yapılarak diğer tüplere 120 μ L aktarım yapıldı (Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6 ve Şekil 3.7). Böylece her bir kit için farklı konsantrasyonlarda 6 adet standart elde edildi.
- ✓ Plâğın 1.kuyucuğundan itibaren örnekler 40 μ L ve üzerine 10 μ L MIG/CXCL9, IP10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ antikorları (her biri kendi plaklarına ayrı ayrı) olmak üzere toplam 50 μ L olarak pipetlendi.
- ✓ Örneklerin bitiminde ise standartlar sırasıyla yoğunluktan az konsantrasyona doğru 50 μ L olacak şekilde kontrol amaçlı ikişer kere pipetlendi.
- ✓ Örnekler ve standartlar pipetlendikten sonra tüm örnek ve standartlara 50 μ L Streptavidin-HRP eklendi.
- ✓ Mikroelisa plâğının üzeri seal bant ile kapatılarak (İnkübasyon 37°C'de olacağından buharlaşma ile örnek kaybı olmaması için) 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

- ✓ İnkübasyon sonucunda istenmeyen bağlanmaların temizlenmesi/arındırılması amacıyla 5 kere (5x350 µL) 350 µL otomatik yıkama cihazı ile yıkama yapıldı.
- ✓ Yıkamadan sonra tüm kuyucuklara (boş kuyucuk dahil) 50 µL kromojen A reagent ve 50 µL kromojen B reagent eklendi.
- ✓ Üzeri yine temiz bir seal ile kapatılan plak 37°C'de 10 dakika karanlıkta üstü kapatılarak inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Süre sonunda reaksiyonun sonlandırılması için 50 µL Stop solüsyon eklendi.
- ✓ 10 dakika içerisinde 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutularak "Optical density" (Optik yoğunluk) (OD) değerleri belirlendi.
- ✓ Standartlardan elde edilen OD değerleri kullanılarak standart eğri grafiği çizildi. Olgu ve kontrollerin OD değerleri standart eğriye göre değerlendirilerek sitokin ve kemokinlerin konsantrasyonları hesaplandı.
- ✚ MIG/CXCL9 kiti için hazırlanan ilk standart tüpünde 8000 ng/L, 2. tüpte 4000 ng/L, 3. tüpte 2000 ng/L, 4.tüpte 1000 ng/L, 5.tüpte 500 ng/L ve 6.tüpte 250 ng/L lik konsantrasyonlarda standartlar elde edildi (Şekil 3.4).



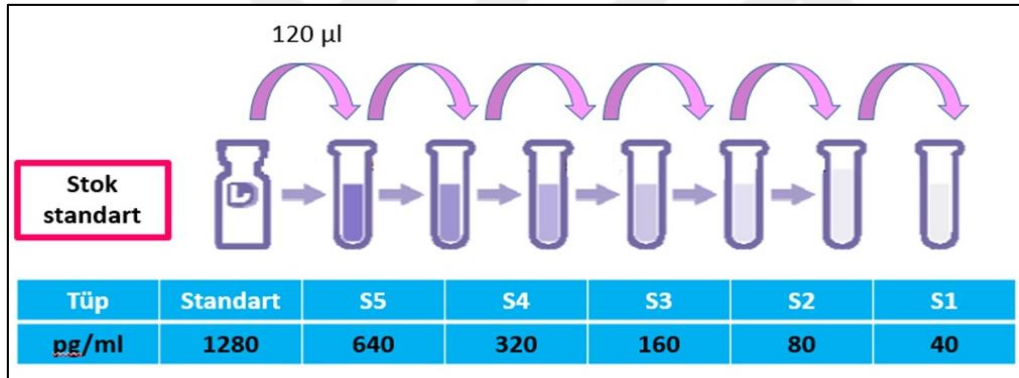
Şekil 3.4. ELİSA standart dilüsyon hazırlığı (MIG/CXCL9)

- ✓ MIG/CXCL9 ELİSA kitinin saptama aralığı 20 ng/L-6000 ng/L aralığında olup saptayabildiği en düşük konsantrasyon değeri ise 10,01 ng/L'dir.
- ✚ IP-10/CXCL10 kiti için hazırlanan ilk standart tüpünde 6400 pg/ml, 2. tüpte 3200 pg/ml, 3. tüpte 1600 pg/ml, 4.tüpte 800 pg/ml, 5.tüpte 400 pg/ml ve 6.tüpte 200 pg/ml lik konsantrasyonlarda standartlar elde edildi (Şekil 3.5).



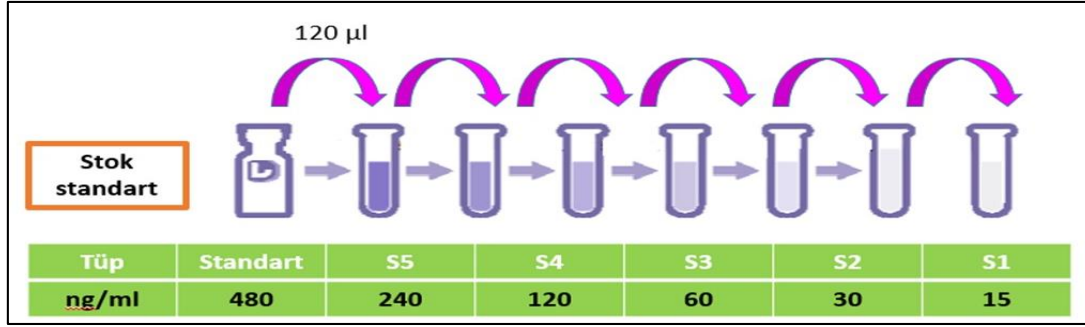
Şekil 3.5. ELİSA standart dilüsyon hazırlığı (IP-10/CXCL10)

- ✓ CXCL10/IP-10 ELİSA kitinin saptama aralığı 20 pg/ml-6000 pg/ml aralığında olup saptayabildiği en düşük konsantrasyon değeri ise 10,23 pg/ml'dir.
- ✚ I-TAC/CXCL11 kiti için hazırlanan ilk standart tüpünde 1280 pg/ml, 2. tüpte 640 pg/ml, 3. tüpte 320 pg/ml, 4.tüpte 160 pg/ml, 5.tüpte 80 pg/ml ve 6.tüpte 40 pg/ml lik konsantrasyonlarda standartlar elde edildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. ELİSA standart dilüsyon hazırlığı (I-TAC/CXCL11)

- ✓ I-TAC/CXCL11 ELİSA kitinin saptama aralığı 5 pg/ml-1000 pg/ml aralığında olup saptayabildiği en düşük konsantrasyon değeri ise 2,48 pg/ml'dir.
- ✚ IFN-γ kiti için hazırlanan ilk standart tüpünde 480 ng/mL, 2. tüpte 240 ng/mL, 3. tüpte 120 ng/mL, 4.tüpte 60 ng/mL, 5.tüpte 30 ng/mL ve 6.tüpte 15 ng/mL lik konsantrasyonlarda standartlar elde edildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.7. ELİSA standart dilüsyon hazırlığı (IFN- γ)

- ✓ IFN- γ ELİSA kitinin saptama aralığı 1 ng/ml-700 ng/ml aralığında olup saptayabildiği en düşük konsantrasyon değeri ise 0,49 ng/ml'dir.

3.4. İstatistiksel Analiz

ELİSA testlerinin sonucunda elde edilen konsantrasyonları bilinen standart solüsyonların OD değerleri ile örneklerin OD değerleri Excel programına kaydedilerek konsantrasyonlar regresyon-korelasyon analizi ile hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler IBM SPSS for Windows Version 22.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen olgu ve kontrollerin demografik verilerinin değerlendirilmesinde yüzde dağılımları kullanılmıştır. Gruplar karşılaştırılmadan önce verilerin normal dağılım gösterip göstermediği analitik yöntemlerden biri olan Kolmogorov-Smirnov testi ile incelenmiş, veriler normal dağılmadığından analizler non-parametrik testler kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda yer alan iki grup (olgu ve kontrol) arasında sayısal bir değişkenin farkının karşılaştırılması için veriler normal dağılmadığından Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Aynı gruba ait farklı ölçümlerin karşılaştırılması için ikiden fazla ölçümle elde edilen sayısal değişkenin değerlerinde zamana bağlı (24-48-72 saat) olarak ortaya çıkan değişimler, veriler yine normal dağılmadığı için Friedman testi ile analiz edilmiştir. Bu testin sonucunda elde edilen p değeri 0,05'ten küçük saptandığında farklı zamanlarda yapılan ölçümler için istatistiksel olarak anlamlı bir farktan bahsedilir. Bu durumda aynı gruba ait farklı ölçümlerin zamana bağlı değişiminde ikişerli olarak (24-48, 48-72, 24-72 gibi) karşılaştırılması için ise Wilcoxon İşaretili Sıralar testi kullanılmıştır. Yapılan tüm değerlendirmelerin sonucunda istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamıza, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ile Nöroloji polikliniklerine başvuran ve Lyme hastalığı tanısı alan olgular ve Lyme hastalığı yönünden negatif olan sağlıklı bireyler dahil edildi.

Çalışma grubuna 13 ECM, 7 LA, 10 LNB ve 10 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 40 kişi dahil edildi. Dahil edilen olgu grubunun 13'ü erkek, 17'si kadın kontrol grubunun ise 5'i erkek, 5'i kadındı (Çizelge 4.1). Gruplar arasında yaş ve cinsiyet karşılaştırılması yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Lyme hastalarını oluşturan olgu grubu VDRL, TPHA testleri yönünden tarandı. VDRL, TPHA test sonuçları pozitif olan bireyler çalışmaya dahil edilmedi. Olgularımızın kene öyküsünün (temas ve/veya ısırma) olup olmadığı uygulanan anket formu ile sorgulanarak olgular klinik yönden değerlendirildi. Hücrelerin cihazdaki sayım sonrasındaki mononükleer canlı hücre (PBMC) sayıları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Lyme hastalarına (n=30) ait demografik veriler, kene öyküsü ve mononükleer canlı hücre (PBMC) sayıları

No	Yaş	Cinsiyet	Grup	Kene temas/ısırma	PBMC sayısı/mL
1	28	E	ECM	Evet	3.35×10^5
2	24	E	ECM	Evet	4.00×10^6
3	68	E	ECM	Evet	8.79×10^4
4	60	E	ECM	Evet	1.15×10^5
5	47	E	ECM	Evet	7.69×10^4
6	23	K	ECM	Evet	4.28×10^5
7	65	E	ECM	Evet	9.90×10^6
8	68	K	ECM	Evet	2.97×10^5
9	22	K	ECM	Evet	1.48×10^5
10	37	K	ECM	Evet	4.5×10^5
11	51	E	ECM	Evet	1.87×10^5
12	53	K	ECM	Hayır	1.24×10^5
13	36	K	ECM	Hatırlamıyor	2.41×10^6
14	30	E	LA	Evet	5.49×10^4
15	56	K	LA	Hatırlamıyor	5.66×10^5
16	54	K	LA	Hayır	1.26×10^5
17	28	E	LA	Hatırlamıyor	1.37×10^6
18	69	K	LA	Hayır	2.21×10^4
19	57	K	LA	Hayır	4.16×10^4
20	27	K	LA	Hayır	4.34×10^5
21	23	K	LNB	Hayır	5.49×10^3
22	43	E	LNB	Hayır	1.65×10^4
23	55	K	LNB	Evet	1.16×10^6
24	50	K	LNB	Hatırlamıyor	5.49×10^3
25	37	E	LNB	Hayır	1.65×10^5
26	26	E	LNB	Hayır	7.14×10^4
27	33	E	LNB	Hayır	8.46×10^5
28	16	K	LNB	Hayır	2.22×10^4
29	54	K	LNB	Evet	2.20×10^5
30	42	K	LNB	Evet	1.14×10^5

*Olgulardan hemogram tüpüne alınan tam kan örneklerinden izole edilen PBMC'lerin otomatize hücre sayım cihazı ile sayılan mL'deki canlı hücre sayıları. ECM: Eritema kronikum migrans, LA: Lyme artrit, LNB: Lyme nöroborelyoz

Hastaların ilk değerlendirilmeleri yapılırken anket ile pikniğe gitme sıklığı ve/veya ormanlık alan gibi yeşillik alanlarda bulunup bulunmadıkları ve seyahat öyküleri de değerlendirilerek klinik bulgular açısından farklılık olup olmadığı karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Olguların pikniğe gitme sıklığı ve seyahat öykülerine ait veriler

Klinik	Pikniğe gitme sıklığı	Seyahat öyküsü
ECM	Yok	Yok
ECM	Haftada 1	Yok
ECM	Yaz aylarında	Yurtiçi
ECM	Her hafta	Yok
ECM	Yaz aylarında	Yok
ECM	Yok	Yok
ECM	Yok	Yok
ECM	Yok	Yok
ECM	Her hafta	Yok
ECM	Haftada 1	Yok
ECM	Nadir	Yok
ECM	Yok	Yok
ECM	Yok	Yok
LA	Çok sık	Yok
LA	Yaz ayında	Yurtdışı
LA	Sıklıkla	Yok
LA	Bahar ve yaz aylarında	Yurtiçi
LA	Yok	Yok
LA	Yılda 2-3 kez	Yok
LA	Çok sık	Yurtiçi
LNB	Yaz aylarında	Yurtdışı
LNB	Yok	Yok
LNB	Yok	Yok
LNB	Yok	Yok
LNB	Yok	Yurtdışı
LNB	İki haftada 1	Yurtiçi
LNB	Yok	Yok
LNB	Yaz aylarında	Yok
LNB	Yılda 3-4 kez	Yok
LNB	Yok	Yok

ECM: Eritema kronikum migrans, LA: Lyme artrit, LNB: Lyme nöroborelyoz

Çalışmamıza dahil edilen sağlıklı kontrol (n=10) grubuna ait demografik veriler, mL'deki PBMC sayıları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Sağlıklı kontrollere ait demografik veriler, mL'deki canlı PBMC sayıları

No	Yaş	Cinsiyet	PBMC sayısı/mL
1	67	K	1.92×10^5
2	49	K	1.59×10^5
3	51	E	3.63×10^6
4	32	E	7.86×10^5
5	35	K	1.65×10^5
6	41	E	3.57×10^5
7	38	E	1.4×10^5
8	39	E	3.63×10^5
9	41	K	3.02×10^5
10	29	K	1.59×10^5

Çalışmamıza dahil edilen olguların serolojik test sonuçları değerlendirildiğinde ELİSA IgG için 30 olgunun 12'si pozitif (%40), 3'ü greyzon (%10), 15'i (%50) ise negatifti. ELİSA IgG testinde pozitif saptanan 12 olgunun 1'i (%8,3) ECM, 4'ü LA (%33,3) ve 7'si (%58,3) ise LNB olgularına aitti. ELİSA IgM için 30 olgudan 5'i pozitif (%16,7), 2'si greyzon (%6,6) ve 23'ü (%76,7) ise negatif olarak saptandı. ELİSA IgM testindeki 5 pozitifliğin 4'ü ECM (%80) 1'i de LA olgularına (%20) aitti. Olguların WB bant incelemesinde tüm olgularda (n=30) OspC bandının pozitif olarak sonuçlandığı görüldü. p100/83 bandı ECM (n=13) ve LA (n=7) olgularında saptanmazken, LNB (n=10) olgularının 7'sinde (%70) pozitif olarak saptandı. VlsE bandı ECM (n=13) olgularının 12'sinde (%92,3) LNB (n=10) olgularının ise tamamında (%100) pozitif olarak bulunurken LA (n=7) olgularının yalnızca 2'sinde pozitif (%28,6) olarak saptandı. p58 pozitifliği ECM (n=13) olgularının yalnızca 1'inde (%7,7) LNB (n=10) olgularının ise 6'sında (%60) görülürken LA (n=7) olgularının hiçbirinde p58 pozitifliğine rastlanmadı. ECM (n=13) ve LNB (n=10) olgularımızda Fla/p41 pozitifliği görülmezken yalnız 1 LA (n=7) olgumuzda Fla/p41 pozitifliği (%14,3) saptanmıştır. ECM (n=13) olgularının 9'unda (%69,2) LA (n=7) olgularının 6'sında (%85,7) LNB (n=10) olgularının ise 3'ünde (%30) p39 pozitifliği saptandı. OspA bandı ECM (n=13) olgularının hiçbirinde saptanmazken, LA (n=7) olgularının 2'si (%28,6) LNB (n=10) olgularının ise 3'ü (%30) bu antijen yönünden pozitif. p18 bandı LNB (n=10) olgularının 3'ünde (%30), LA (n=7) olgularının 1'inde (%14,3) görülürken ECM (n=13) olgularının ise hiçbirinde saptanmadı. Çalışmamıza dahil edilen olguların ELİSA, WB test sonuçları ve seçili klinik özellikleri Çizelge 4.4, 4.5 ve 4.6'da özetlenmiştir.

Çizelge 4.4. ECM olgularının ELİSA, WB test sonuçları ve seçili klinik özellikleri

ECM (n=13)	ELİSA IgG	ELİSA IgM	Klinik belirtiler	Kene ile temastan sonra lezyon ve septomların ortaya çıkma süresi (gün)	WB bant pozitifliği							
					p100	VlsE	p58	p41	p39	OspC	OspA	p18
Olgu 1	-	-	Güç kaybı	15		+				+		
Olgu 2	-	+	Deride kızarıklık	30		+			+	+		
Olgu 3	-	-	ECM	3		+				+		
Olgu 4	Gr	+	ECM, halsizlik, gece terlemesi	30		+			+	+		
Olgu 5	-	Gr	ECM, deride kızarıklık, kaşıntı	7		+				+		
Olgu 6	-	-	Deride kızarıklık, halsizlik, yorgunluk	90		+			+	+		
Olgu 7	-	-	Yorgunluk, halsizlik, uyuşukluk	120		+			+	+		
Olgu 8	-	-	Ateş, halsizlik, yoğunluk, uykusuzluk	3		+				+		
Olgu 9	-	-	ECM, ellerde titreme, baş dönmesi, saç dökülmesi	60		+			+	+		
Olgu 10	-	+	Eklem ağrısı, ellerde şişlik	30		+			+	+		
Olgu 11	+	-	Eklem ağrısı, baş ağrısı	7*		+	+		+	+		
Olgu 12	-	+	Deride kızarıklık ve yanma	Bilinmiyor		+			+	+		
Olgu 13	-	Gr	Yorgunluk, halsizlik, eklem ağrıları	60		+			+	+		

*Olgu 11'in, 4-5 yıl önce de kene ısırma öyküsü mevcuttur. ECM: Eritema kronikum migrans, Gr: Greyzon, -: Negatif, +: Pozitif

ECM: 13 olgu IgG: Pozitif: 1, Greyzon: 1, Negatif: 11

IgM: Pozitif: 4, Greyzon: 2, Negatif: 7

Çizelge 4.5. LA olgularının ELİSA, WB test sonuçları ve seçili klinik özellikleri

LA (n=7)	ELİSA IgG	ELİSA IgM	Klinik belirtiler	Kene ile temastan sonra septomların ortaya çıkma süresi (ay)	WB bant pozitifliği							
					p100	VlsE	p58	p41	p39	OspC	OspA	p18
Olgu 1	+	-	Ateş, yaygın eklem ve kas ağrıları, yüz ve kaslarda seğirme, unutkanlık, duylarda azalma	12-24					+	+		
Olgu 2	-	-	Eklem ağrısı, kaslarda güçsüzlük, deride döküntüler	6					+	+		
Olgu 3	+	+	Yaygın eklem ağrısı, kaslarda güçsüzlük, unutkanlık, halsizlik	12		+				+		+
Olgu 4	+	-	Grip benzeri semptomlar, seymeler, kasıklarda ağrı, ateş, eklem ağrısı, göğüste sıkışma, uyuşukluk	36-48		+		+	+	+		
Olgu 5	Gr	-	Elde kasılma, eklemlerde şişlik, kaslarda ağrı	12					+	+	+	
Olgu 6	-	-	Eklemlerde ağrı ve şişlik, uyuşukluk, unutkanlık	6					+	+		
Olgu 7	+	-	Ateş, kulak çınlaması, eklem ağrısı, uykusuzluk, dikkat azalması, titreme, gözde seymeler	12					+	+	+	

LA: Lyme artrit, Gr: Greyzon, -: Negatif, +: Pozitif

LA: 7 olgu IgG: Pozitif: 4, Greyzon: 1, Negatif: 2

IgM: Pozitif: 1, Greyzon: 0, Negatif: 6

Çizelge 4.6. LNB olgularının ELİSA, WB test sonuçları ve seçili klinik özellikleri

LNB (n=10)	ELİSA IgG	ELİSA IgM	Klinik belirtiler	Kene ile temastan sonra semptomların ortaya çıkma süresi (ay)	WB bant pozitifliği							
					p100	VlsE	p58	p41	p39	OspC	OspA	p18
Olgu 1	+	-	Ellerde uyuşma, güç kaybı, unutkanlık	12-24	+	+	+			+		
Olgu 2	-	-	Kas ağrısı, güç kaybı, eklemlerde gerilme, ayaklarda his kaybı, nefes darlığı, uykusuzluk	12	+	+				+	+	
Olgu 3	-	-	Ateş, eklem ve kas ağrıları, sanrılar görme, unutkanlık	36	+	+	+			+	+	
Olgu 4	Gr	-	Uyuşukluk, uykusuzluk, lenf bezlerinde ağrı, kulakta çınlama ve ağrı, denge kaybı	12		+	+			+		
Olgu 5	+	-	Kolda uyuşma, göğüste sıkışma, eklem ağrısı	6	+	+	+			+		
Olgu 6	+	-	Eklem ağrısı, ense sertliği	12	+	+				+		+
Olgu 7	+	-	Kulak çınlaması, ellerde güçsüzlük, bayılma, vücudun farklı bölgelerinde kızarıklık	24		+				+		+
Olgu 8	+	-	Ani görme kaybı	2	+	+	+		+	+		
Olgu 9	+	-	Unutkanlık, ense sertliği, eklem ağrısı	120	+	+			+	+	+	
Olgu 10	+	-	Eklem ağrısı, ateş, ödem, ayaklarda his kaybı, yürümekte zorluk, esneme, yüzde seyirme	180		+	+		+	+		+

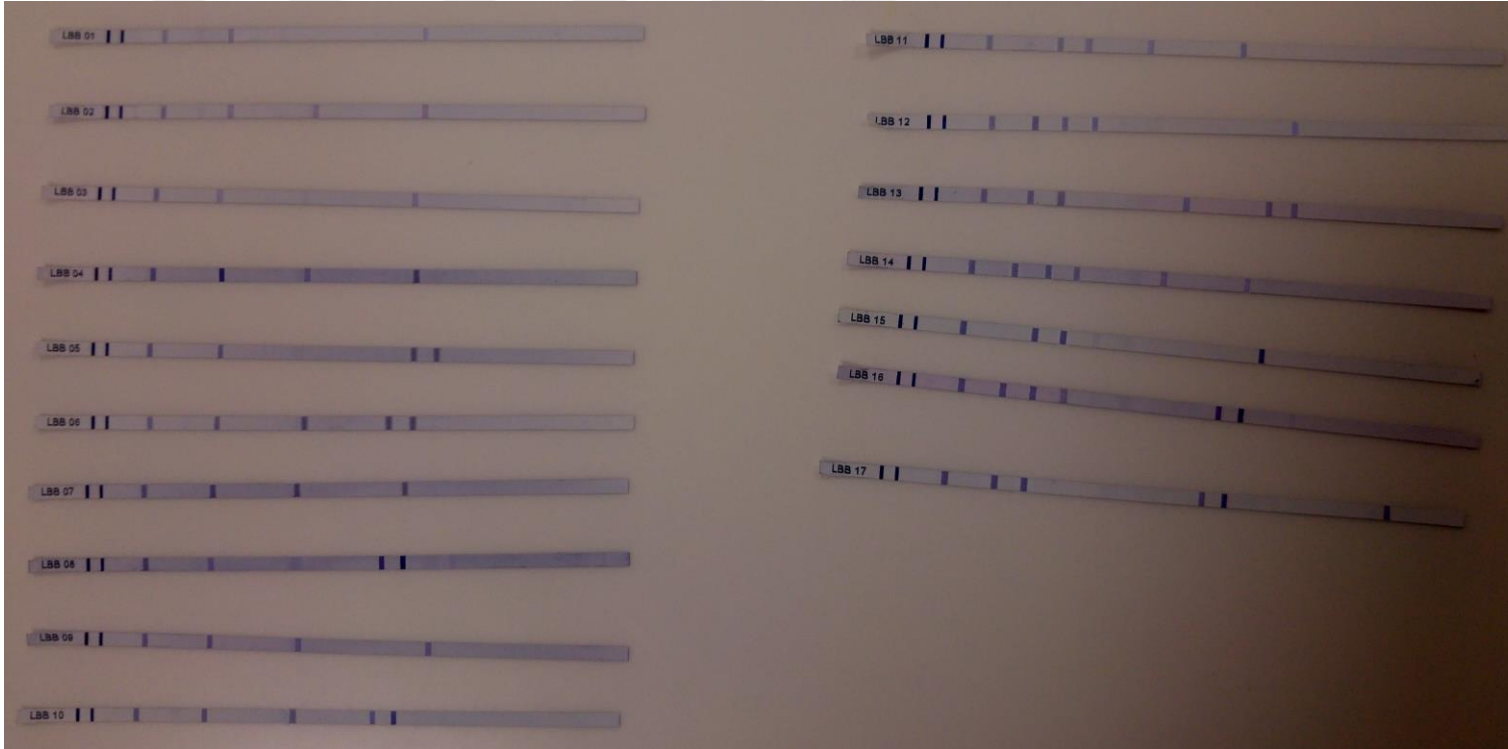
LNB: Lyme nöroborelyoz, Gr: Greyzon, -: Negatif, +: Pozitif

LNB: 10 olgu IgG: Pozitif: 7, Greyzon: 1, Negatif: 2

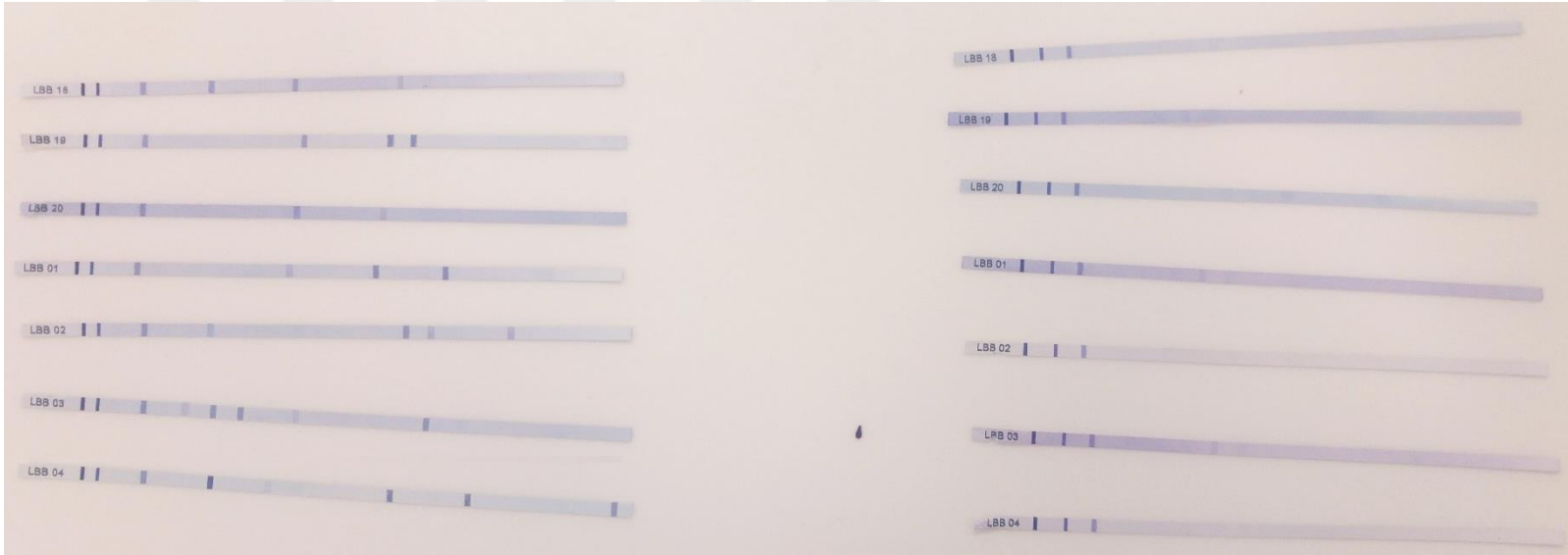
TÜM OLGULAR TOPLAM : 12 IgG Pozitif, 3 IgG Greyzon; 15 IgG Negatif

IgM: Pozitif: 0, Greyzon: 0, Negatif: 10

5 IgM Pozitif; 2 IgM Greyzon; 23 IgM Negatif



Resim 4.1. Olgulara ait *B.burgdorferi* WB IgG bant pozitiflikleri



Resim 4.2. Olgulara ait *B.burgdorferi* WB IgG bant pozitiflikleri ve WB IgM bant negatiflikleri

4.1. Lyme Olgu Gruplarında, rOspC ile Uyarım Sonrası Zamana Bağlı Olarak Toplanan PBMC Kültür Süpernatantlarında Sitokinlerin Ölçüm Sonuçları

Çizelge 4.7. ECM olgularının rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri

Klinik	Sitokin	Süre (saat)	Ortalama $\pm$ SS*	Ortanca (Min-Max)	p değeri
ECM (n=13)	MIG/CXCL9 (pg/mL)	24	154,0 $\pm$ 41,4	146,8 (69,4-215,9)	0,000 ^a
		48	84,3 $\pm$ 69,2	95,4 (12,2-198,8)	
		72	58,4 $\pm$ 69,3	25,7 (11,5-187,3)	
	IP-10/CXCL10 (pg/mL)	24	135,2 $\pm$ 72,3	155,1 (14,9-227,1)	0,146 ^a
		48	87,9 $\pm$ 61,8	100,2 (14,1-178,2)	
		72	117,9 $\pm$ 64,4	140,9 (14,3-205,5)	
	I-TAC/CXCL11 (pg/mL)	24	222,7 $\pm$ 118,0	288,7 (22,5-327,4)	0,584 ^a
		48	214,2 $\pm$ 112,1	265,9 (21,9-326,9)	
		72	268,6 $\pm$ 78,1	274,6 (22,1-354,1)	
	IFN- γ (ng/mL)	24	133,9 $\pm$ 58,4	153,6 (13,8-203,3)	0,368 ^a
		48	111,5 $\pm$ 56,6	132,7 (12,8-178,2)	
		72	131,8 $\pm$ 39,8	139,2 (12,3-180,2)	

SS: Standart sapma, ECM: Eritema kronikum migrans, IFN: İnterferon, MIG: Monokine induced by gamma interferon, IP-10: Interferon gamma-induced protein 10, I-TAC: Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant, CXCL: Kemokin ligand

*p<0,05 a: Friedman testi

rOspC ile uyarımı sonrası ECM olgularının 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri karşılaştırıldığında yalnızca MIG/CXCL9 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($\chi^2=17,23$, p=0,000) (Çizelge 4.7). İstatistiksel olarak anlamlı olan MIG/CXCL9'un farklı zaman dilimlerindeki ölçümleri karşılaştırıldığında 24. saatteki artışın 48. ve 72. saatlere göre anlamlı ölçüde (sırası ile p=0.002 ve p=0.001) arttığı saptanmıştır.

Çizelge 4.8. LA olgularının rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri

Klinik	Sitokin	Süre (saat)	Ortalama $\pm$ SS*	Ortanca (Min-Max)	p değeri
LA (n=7)	MIG/CXCL9 (pg/mL)	24	97,9 $\pm$ 81,2	110,4 (12,2-226,8)	0,867 ^a
		48	75,1 $\pm$ 56,7	96,8 (11,5-163)	
		72	107,1 $\pm$ 80,1	160,7 (11,9-197,5)	
	IP-10/CXCL10 (pg/mL)	24	146,5 $\pm$ 66,3	165,5 (13,1-247,9)	0,565 ^a
		48	113,1 $\pm$ 82,7	171,8 (13,5-210,1)	
		72	96,2 $\pm$ 71,5	126,3 (14,8-189,2)	
	I-TAC/CXCL11 (pg/mL)	24	325,7 $\pm$ 29,3	328,7 (28,6-367,8)	0,018 ^a
		48	237,9 $\pm$ 91,8	272,9 (22,5-312,3)	
		72	217,1 $\pm$ 91,7	233,9 (20,8-347,4)	
	IFN- γ (ng/mL)	24	164,1 $\pm$ 28,2	152,1 (141,8-227,9)	0,050 ^a
		48	93,3 $\pm$ 69,4	140,4 (13,3-171,9)	
		72	117,7 $\pm$ 39,7	140,1 (66,1-164)	

SS: Standart sapma, LA: Lyme artriti, IFN: İnterferon, MIG: Monokine induced by gamma interferon, IP-10: Interferon gamma-induced protein 10, I-TAC: Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant, CXCL: Kemokin ligand

*p<0,05 a: Friedman testi

rOspC ile uyarımı sonrası LA olgularının 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri karşılaştırıldığında yalnızca I-TAC/CXCL11 düzeyinin ilk 24 saatte diğer saatlerden anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir ($\chi^2 = 8,000$, $p = 0,018$). İlk 24 saatte IFN- γ düzeyi yüksek bulunmuş zamanla azaldığı gözlemlenmiştir. Ancak saatler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($\chi^2=6,000$, $p=0,05$) (Çizelge 4.8). İstatistiksel olarak anlamlı olan I-TAC/CXCL11'in farklı zaman dilimlerindeki ölçümleri karşılaştırıldığında 24. saatteki artışın 48. ve 72. saatlere göre anlamlı ölçüde (sırası ile $p=0,018$, $p=0,028$) arttığı saptanmıştır.

Çizelge 4.9. LNB olgularının rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri

Klinik	Sitokin	Süre (saat)	Ortalama $\pm$ SS*	Ortanca (Min-Max)	p değeri
LNB (n=10)	MIG/CXCL9 (pg/mL)	24	174,8 $\pm$ 56,8	189,5 (12,3-213,3)	0,122 ^a
		48	125,9 $\pm$ 61,6	157,1 (11,9-176,7)	
		72	126,6 $\pm$ 94	165,6 (11,5-234,6)	
	IP-10/CXCL10 (pg/mL)	24	165,9 $\pm$ 65,2	176,8 (13,5-280,7)	0,122 ^a
		48	144,6 $\pm$ 50,4	158,7 (13,8-195,7)	
		72	74,4 $\pm$ 72,1	19,7 (14,5-188,4)	
	I-TAC/CXCL11 (pg/mL)	24	296,5 $\pm$ 93,9	321,5 (23,4-373,9)	0,007 ^a
		48	198,8 $\pm$ 75,5	197,4 (21,7-283,4)	
		72	249,1 $\pm$ 17,9	252,2 (22,8-280,7)	
	IFN- γ (ng/mL)	24	117,1 $\pm$ 54	134,6 (13,3-169,9)	0,741 ^a
		48	133,6 $\pm$ 65,8	162,7 (11,2-210,5)	
		72	109,2 $\pm$ 52	134,2 (13,1-153)	

SS: Standart sapma, LNB: Lyme nöroborelyoz, IFN: İnterferon, MIG: Monokine induced by gamma interferon, IP-10: Interferon gamma-induced protein 10, I-TAC: Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant, CXCL: Kemokin ligand

* $p < 0,05$ a: Friedman testi

rOspC ile uyarımı sonrası LNB olgularının 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri karşılaştırıldığında LA olgularında olduğu gibi yalnızca I-TAC/CXCL11 düzeyinin ilk 24 saatte diğer saatlerden anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir ($\chi^2=9,800$, $p=0,007$). (Çizelge 4.9). İstatistiksel olarak anlamlı olan I-TAC/CXCL11'in farklı zaman dilimlerindeki ölçümleri karşılaştırıldığında LNB olgularında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

4.2. Lyme Olguları ile Kontrol Grubunun rOspC ile Uyarım Sonrası Zamana Bağlı Olarak Toplanan PBMC Kültür Süpernatantlarında Sitokin Düzeylerinin Karşılaştırılması

Çizelge 4.10. ECM olguları ve kontrol grubunun rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri

Sitokin	Süre (Saat)	ECM (n=13)		Sağlıklı Kontrol (n=10)		P değeri
		Ortalama $\pm$ SS*	Ortanca (Min-Max)	Ortalama $\pm$ SS*	Ortanca (Min-Max)	
MIG/CXCL9 (pg/mL)	24	154,0 $\pm$ 41,4	146,8 (69,4-215,9)	167,8 $\pm$ 54,3	184,2 (15,8-210,5)	0,664 ^c
	48	84,3 $\pm$ 69,2	95,4 (12,2-198,8)	116,6 $\pm$ 59,3	128,6 (11,4-177,5)	0,292 ^c
	72	58,4 $\pm$ 69,3	25,7 (11,5-187,3)	104,5 $\pm$ 90,5	103,5 (11,4-205,7)	0,535 ^c
IP-10/CXCL10 (pg/mL)	24	135,2 $\pm$ 72,3	155,1 (14,9-227,1)	65,1 $\pm$ 63,2	15,9 (14,1-174,6)	0,013 ^c
	48	87,9 $\pm$ 61,8	100,2 (14,1-178,2)	136,2 $\pm$ 63	168 (13,8-194,1)	0,107 ^c
	72	117,9 $\pm$ 64,4	140,9 (14,3-205,5)	56,3 $\pm$ 65,6	17,1 (14,5-205,6)	0,137 ^c
I-TAC/CXCL11 (pg/mL)	24	222,7 $\pm$ 118,0	288,7 (22,5-327,4)	276,5 $\pm$ 88	311,8 (27,4-333,5)	0,352 ^c
	48	214,2 $\pm$ 112,1	265,9 (21,9-326,9)	240 $\pm$ 53,9	236,2 (159,1-322,2)	0,852 ^c
	72	268,6 $\pm$ 78,1	274,6 (22,1-354,1)	238,3 $\pm$ 77	269,2 (22,3-288,1)	0,292 ^c
IFN- γ (ng/mL)	24	133,9 $\pm$ 58,4	153,6 (13,8-203,3)	100,3 $\pm$ 58,8	124,4 (13,4-165,6)	0,094 ^c
	48	111,5 $\pm$ 56,6	132,7 (12,8-178,2)	143 $\pm$ 44	154,9 (13,9-170,2)	0,063 ^c
	72	131,8 $\pm$ 39,8	139,2 (12,3-180,2)	153,9 $\pm$ 30,2	150,5 (83,4-194,9)	0,193 ^c

SS: Standart sapma, ECM: Eritema kronikum migrans, IFN: Interferon, MIG: Monokine induced by gamma interferon, IP-10: Interferon gamma-induced protein 10, I-TAC: Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant, CXCL: Kemokin ligand

*p<0,05 c: Mann-Whitney testi

ECM olguları ve kontrol grubunun rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri karşılaştırıldığında yalnızca IP-10/CXCL10'un 24. saatinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (p=0,013) (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.11. LA olguları ve kontrol grubunun rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri

Sitokin	Süre (Saat)	LA (n=7)		Sağlıklı Kontrol (n=10)		P değeri
		Ortalama $\pm$ SS*	Ortanca (Min-Max)	Ortalama $\pm$ SS*	Ortanca (Min-Max)	
MIG/CXCL9 (pg/mL)	24	97,9 $\pm$ 81,2	110,4 (12,2-226,8)	167,8 $\pm$ 54,3	184,2 (15,8-210,5)	0,008 ^c
	48	75,1 $\pm$ 56,7	96,8 (11,5-163)	116,6 $\pm$ 59,3	128,6 (11,4-177,5)	0,922 ^c
	72	107,1 $\pm$ 80,1	160,7 (11,9-197,5)	104,5 $\pm$ 90,5	103,5 (11,4-205,7)	0,379 ^c
IP-10/CXCL10 (pg/mL)	24	146,5 $\pm$ 66,3	165,5 (13,1-247,9)	65,1 $\pm$ 63,2	15,9 (14,1-174,6)	0,007 ^c
	48	113,1 $\pm$ 82,7	171,8 (13,5-210,1)	136,2 $\pm$ 63	168 (13,8-194,1)	0,435 ^c
	72	96,2 $\pm$ 71,5	126,3 (14,8-189,2)	56,3 $\pm$ 65,6	17,1 (14,5-205,6)	0,143 ^c
I-TAC/CXCL11 (pg/mL)	24	325,7 $\pm$ 29,3	328,7 (28,6-367,8)	276,5 $\pm$ 88	311,8 (27,4-333,5)	0,435 ^c
	48	237,9 $\pm$ 91,8	272,9 (22,5-312,3)	240 $\pm$ 53,9	236,2 (159,1-322,2)	1,000 ^c
	72	217,1 $\pm$ 91,7	233,9 (20,8-347,4)	238,3 $\pm$ 77	269,2 (22,3-288,1)	0,205 ^c
IFN- γ (ng/mL)	24	164,1 $\pm$ 28,2	152,1 (141,8-227,9)	100,3 $\pm$ 58,8	124,4 (13,4-165,6)	0,005 ^c
	48	93,3 $\pm$ 69,4	140,4 (13,3-171,9)	143 $\pm$ 44	154,9 (13,9-170,2)	0,040 ^c
	72	97,9 $\pm$ 81,2	110,4 (12,2-226,8)	153,9 $\pm$ 30,2	150,5 (83,4-194,9)	0,008 ^c

SS: Standart sapma, LA: Lyme artriti, IFN: Interferon, MIG: Monokine induced by gamma interferon, IP-10: Interferon gamma-induced protein 10, I-TAC: Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant, CXCL: Kemokin ligand

*p<0,05 c: Mann-Whitney testi

LA olguları ve kontrol grubunun rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri karşılaştırıldığında MIG/CXCL9 ve IP-10/CXCL10'un 24. saatinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (sırasıyla $p=0,008$, $p=0,007$). IFN- γ düzeylerine bakıldığında ise gruplar arasında her üç saatte (24-48-72) de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (sırasıyla $p=0,005$, $p=0,040$, $p=0,008$) (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.12. LNB olguları ve kontrol grubunun rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri

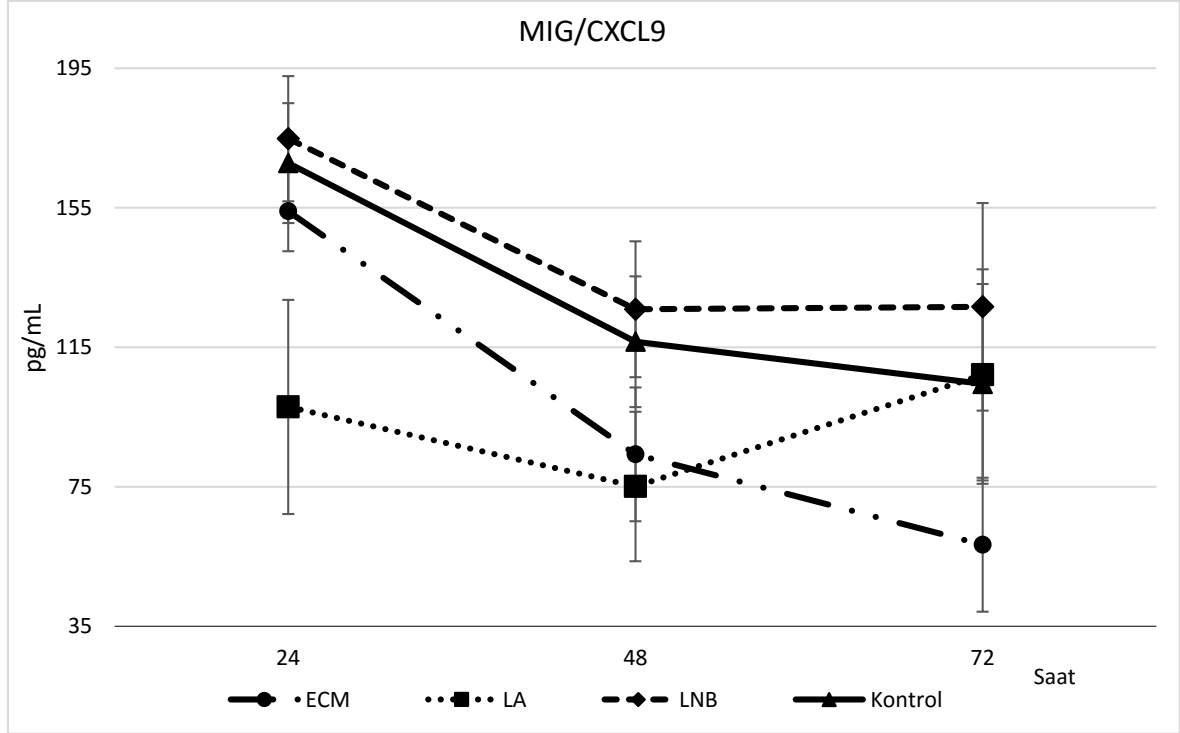
Sitokin	Süre (Saat)	LNB (n=10)		Sağlıklı Kontrol (n=10)		P değeri
		Ortalama $\pm$ SS*	Ortanca (Min-Max)	Ortalama $\pm$ SS*	Ortanca (Min-Max)	
MIG/CXCL9 (pg/mL)	24	174,8 $\pm$ 56,8	189,5 (12,3-213,3)	167,8 $\pm$ 54,3	184,2 (15,8-210,5)	0,597 ^c
	48	125,9 $\pm$ 61,6	157,1 (11,9-176,7)	116,6 $\pm$ 59,3	128,6 (11,4-177,5)	0,880 ^c
	72	126,6 $\pm$ 94,1	165,6 (11,5-234,6)	104,5 $\pm$ 90,5	103,5 (11,4-205,7)	0,199 ^c
IP-10/CXCL10 (pg/mL)	24	165,9 $\pm$ 65,2	176,8 (13,5-280,7)	65,1 $\pm$ 63,2	15,9 (14,1-174,6)	0,016 ^c
	48	144,6 $\pm$ 50,4	158,7 (13,8-195,7)	136,2 $\pm$ 63	168 (13,8-194,1)	0,880 ^c
	72	74,4 $\pm$ 72,1	19,7 (14,5-188,4)	56,3 $\pm$ 65,6	17,1 (14,5-205,6)	0,705 ^c
I-TAC/CXCL11 (pg/mL)	24	296,5 $\pm$ 93,9	321,5 (23,4-373,9)	276,5 $\pm$ 88	311,8 (27,4-333,5)	0,257 ^c
	48	198,8 $\pm$ 75,5	197,4 (21,7-283,4)	240 $\pm$ 53,9	236,2 (159,1-322,2)	0,290 ^c
	72	249,1 $\pm$ 17,9	252,2 (221,8-280,7)	238,3 $\pm$ 77	269,2 (22,3-288,1)	0,257 ^c
IFN- γ (ng/mL)	24	117,1 $\pm$ 54	134,6 (13,3-169,9)	100,3 $\pm$ 58,8	124,4 (13,4-165,6)	0,880 ^c
	48	133,6 $\pm$ 65,8	162,7 (11,2-210,5)	143 $\pm$ 44	154,9 (13,9-170,2)	0,762 ^c
	72	109,2 $\pm$ 51,9	134,2 (13,1-153)	153,9 $\pm$ 30,2	150,5 (83,4-194,9)	0,070 ^c

SS: Standart sapma, LNB: Lyme nöroborelyoz, IFN: Interferon, MIG: Monokine induced by gamma interferon, IP-10: Interferon gamma-induced protein 10, I-TAC: Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant, CXCL: Kemokin ligand

* $p<0,05$ c: Mann-Whitney testi

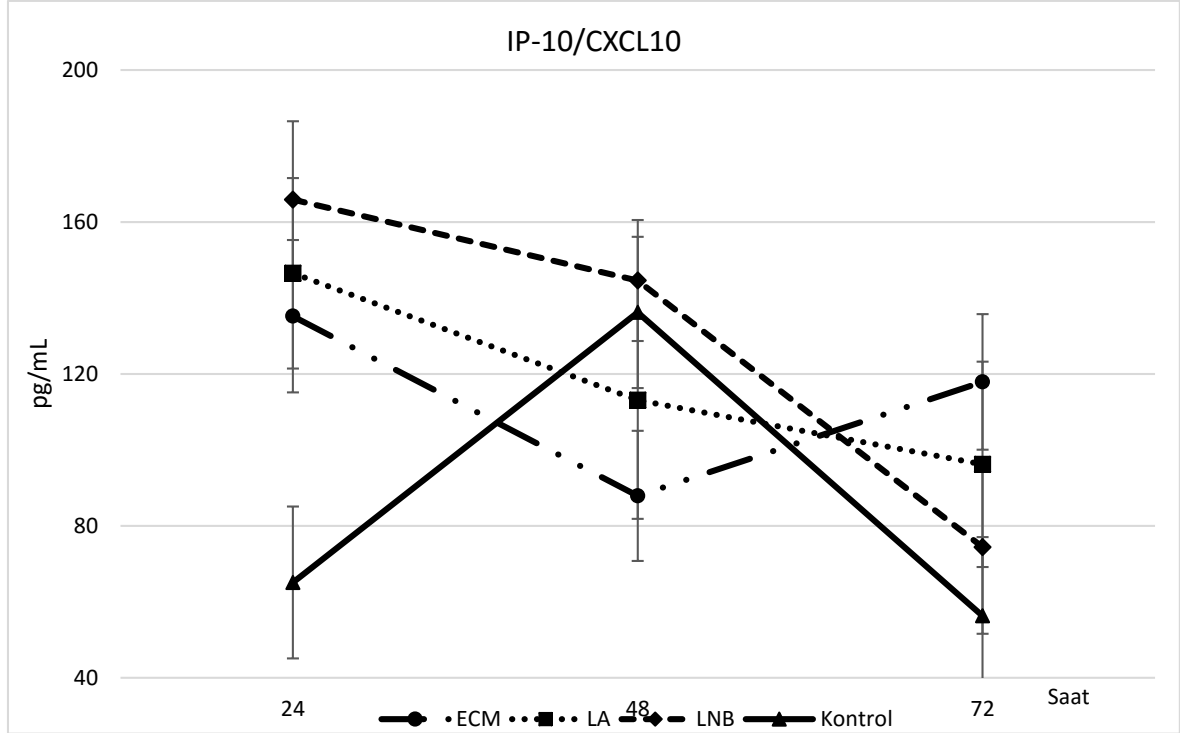
LNB olguları ve kontrol grubunun rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXC10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeyleri karşılaştırıldığında yalnızca IP-10/CXCL10'un 24. saatinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,016$) (Çizelge 4.12).

Lyme olguları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında sitokinlerin zamana bağlı değişimi Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



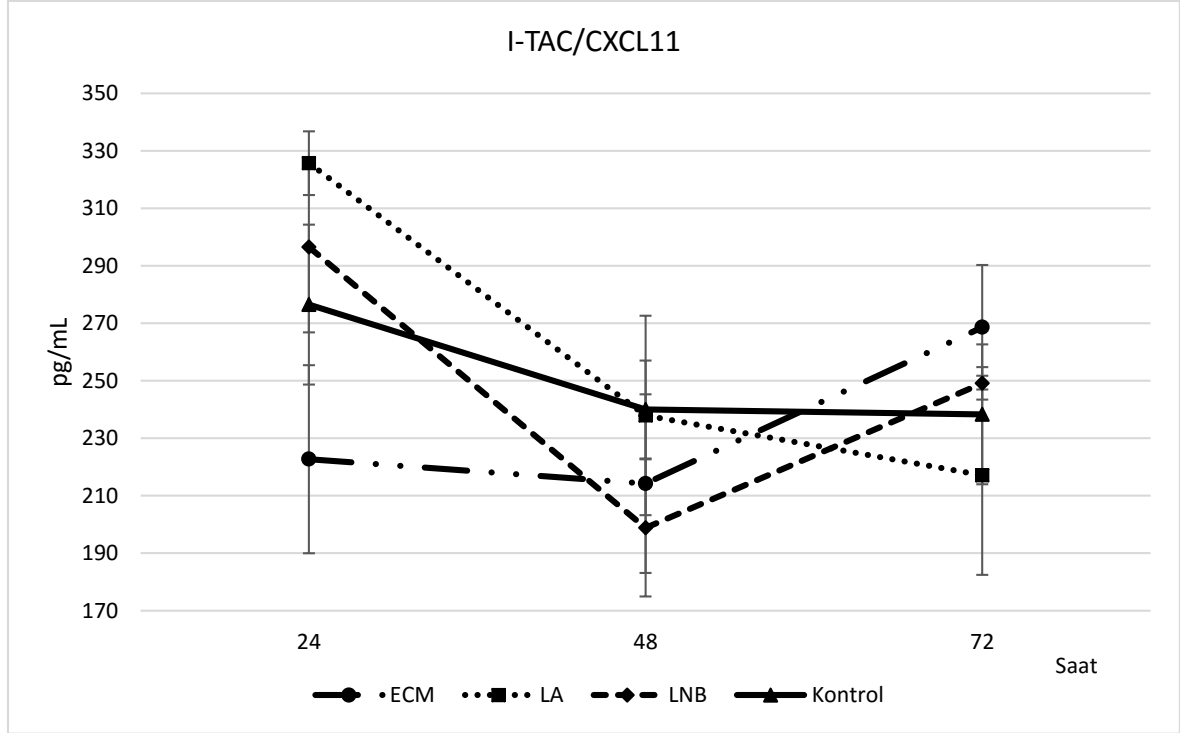
Şekil 4.1. Lyme olguları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında MIG/CXCL9'un zamana bağlı değişimi

Lyme olgularının üç klinik tutulumu (ECM, LA, LNB) ve sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında MIG/CXCL9'un zamana bağlı değişimi değerlendirildiğinde MIG/CXCL9'un ilk 24 saatte LNB ve ECM olgularında kontrol grubu ile daha paralel bir değişim gösterdiği gözlenmiştir. MIG/CXCL9'da 48. saatte her üç klinik tutulum ve kontrol grubunda azalma gözlenirken, 72. saatte yalnızca LA olgularında diğer tutulumlara ve kontrol grubuna göre belirgin bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4.2. Lyme olguları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında IP-10/CXCL10'un zamana bağlı değişimi

Lyme olgularının üç klinik tutulumu (ECM, LA, LNB) ve sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında IP-10/CXCL10'un zamana bağlı değişimi değerlendirildiğinde IP-10/CXCL10'un ilk 24 saatte her üç klinik tutulumda da kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir. LNB olguları kontrol grubu ile 48. saatte paralel bir değişim gösterirken, 72. saatte yalnızca LNB olgularında ECM ve LA olgularına göre IP-10/CXCL10 düzeyinde belirgin bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Lyme olguları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında I-TAC/CXCL11'in zamana bağlı değişimi

Lyme olgularının üç klinik tutulumu (ECM, LA, LNB) ve sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında I-TAC/CXCL11'in zamana bağlı değişimi değerlendirildiğinde I-TAC/CXCL11'in ilk 24 saatte LA ve LNB olgularında kontrol grubu ile daha paralel bir değişim gösterdiği gözlenmiştir. Değişimlere 48. saat için bakıldığında klinik tutulumlar ve kontrol grubu arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Ancak 72. saate doğru ECM ve LNB olgularında kontrol grubu olgularına göre bir artış görülmüştür.

4.3. Hücre hatlarının rOspC ile Uyarım Sonrası Zamana Bağlı Olarak Toplanan Kültür Süpernatantlarında Sitokin Düzeyleri

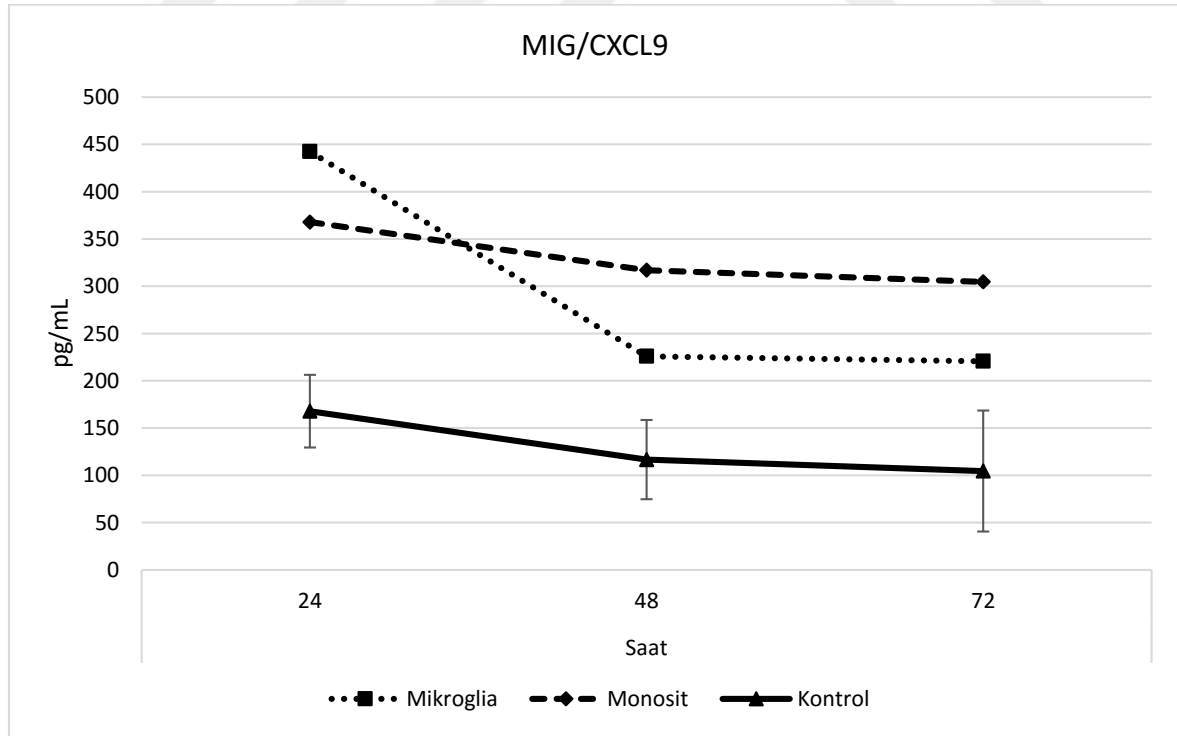
Ayrıca çalışmamızda rekombinant *Borrelia* antijenine karşı bazal sitokin sekresyon düzeylerinin anlaşılabilmesi için, literatürde Lyme in vitro araştırma modellerinde sıklıkla ama genellikle ayrı ayrı, farklı koşullar altında kullanılan mikrogliya ve monosit hücre hatları aynı koşullar altında birlikte kullanılmıştır. Kullanılan mikrogliya ve monosit hücre hatlarının rOspC ile uyarımı sonrasında 24-48-72. saat aralıklarında toplanan kültür süpernatantlarında çalışılan MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ ELİSA test sonuçlarına göre sitokin düzeyleri belirlenmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Mikroglia ve monosit hücre hatları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası zamana bağlı olarak toplanan kültür süpernatantlarında MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeylerinin karşılaştırılması

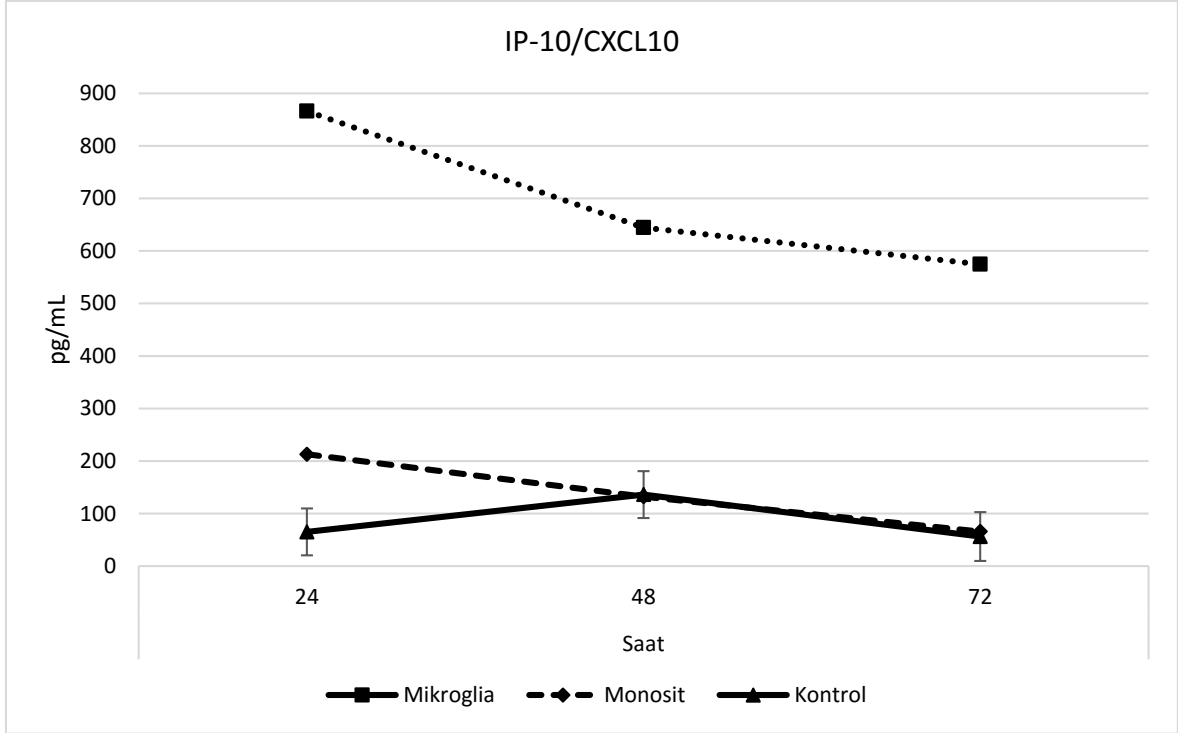
Sitokin	Süre (Saat)	Mikroglia (HMC3)	Monosit (U-937)	Sağlıklı kontrol
		Ortalama	Ortalama	Ortalama
MIG/CXCL9 (pg/mL)	24	442,36	367,8	167,8
	48	225,9	316,9	116,6
	72	220,6	304,56	104,5
IP-10/CXCL10 (pg/mL)	24	865,9	212,85	65,1
	48	644,4	132,1	136,2
	72	574,6	65,8	56,3
I-TAC/CXCL11 (pg/mL)	24	596,5	476,5	276,5
	48	398,7	315,8	240
	72	149,6	283,3	238,3
IFN- γ (ng/mL)	24	682,62	362,16	100,3
	48	600,15	259,24	143
	72	434,28	151,79	153,9

IFN: İnterferon, MIG: Monokine induced by gamma interferon, IP-10: İnterferon gamma-induced protein 10, I-TAC: İnterferon-inducible T-cell alpha chemoattractant, CXCL: Kemokin ligand

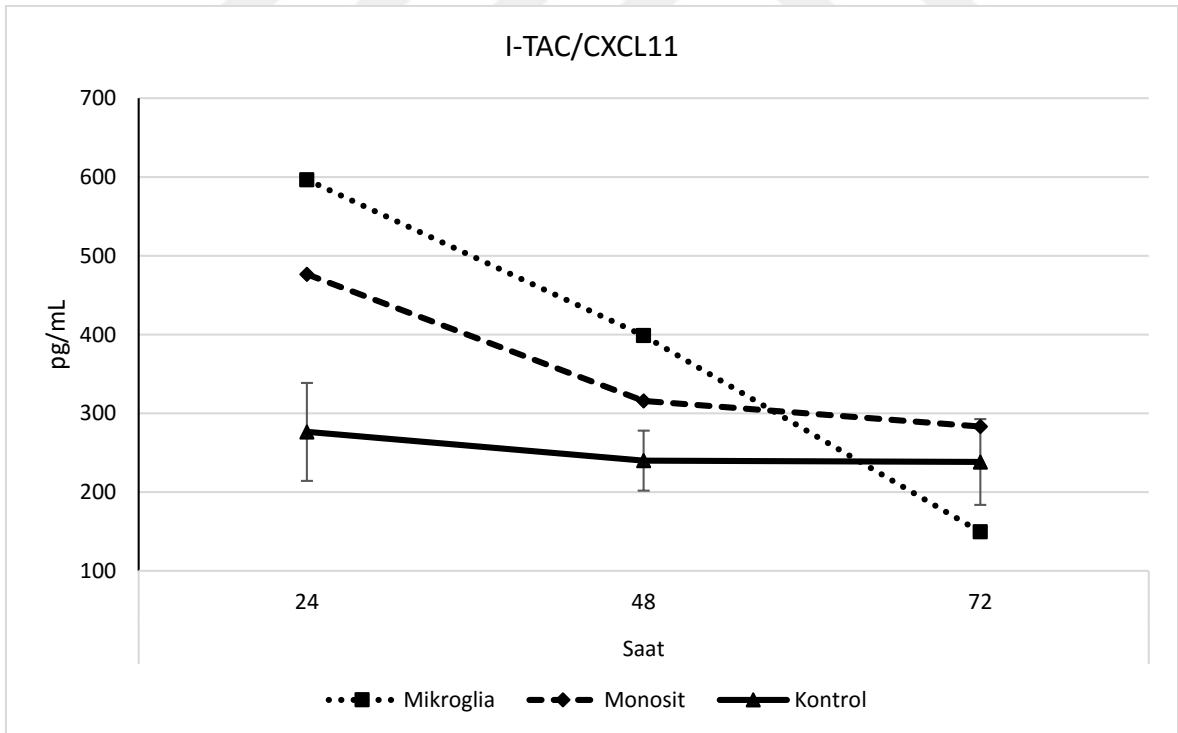
Hücre hatları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında sitokinlerin zamana bağlı değişimi Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Hücre hatları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında MIG/CXCL9'un zamana bağlı değişimi



Şekil 4.5. Hücre hatları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında IP-10/CXCL10'un zamana bağlı değişimi



Şekil 4.6. Hücre hatları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarında I-TAC/CXCL11'in zamana bağlı değişimi

Sitokinlerin hücre hücre hatları ile sağlıklı kontrol grubunun rOspC ile uyarım sonrası toplanan PBMC kültür süpernatantlarındaki değişimleri incelendiğinde her üç

sitokinindeki değişimin monosit hücre hattında kontrol grubuna yakın bir değişim gösterdiği görölmüştür. Özellikle IP-10/CXCL-10'un mikroglia hücre hattında monosit hücre hattı ve kontrol grubuna göre belirgin düzeyde bir artış gösterdiği gözlenmiştir.





5. TARTIŞMA

Lyme borelyozu olarak da isimlendirilen Lyme hastalığı, insanlara *B.burgdorferi* sensu lato kompleksi içerisinde yer alan *B.burgdorferi*, *B.garinii* ve *B.afzelii* türleri ile enfekte olmuş kenelerle temas sonucu ortaya çıkmaktadır. Mikroorganizma hastalığın erken dönemini takiben (olguların bazılarında Eritema kronikum migrans (ECM) adı verilen deri döküntülerinin gözlemlendiği) ilerleyen dönemlerde olgularda Lyme artriti (LA), Lyme nöroborelyoz (LNB) gibi uzun süreli komplikasyonlar ile seyredebilecek hastalıklara da neden olabilmektedir. Grip benzeri semptomlar ile kendisini gösteren birçok hastalığı taklit edebilen Lyme hastalığı, ülkemizde olmasa da dış ülkelerde bildirimi zorunlu hastalıklar içerisinde yer alan bir hastalık grubudur (Halperin, 2018b). Borelyoz tanısı için mikrobiyolojik temel laboratuvar testleri gibi direkt ve seroloji ile WB teknikleri gibi indirekt yöntemler kullanılmaktadır. Tanı ECM gibi tipik bulguların görülmediği ya da ECM varlığının olduğu ancak kene temas öyküsünün bulunmadığı olgular nedeniyle oldukça karmaşık bir hal almaktadır. Bu nedenle yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlardan en az etkilenen tanı yöntemleri kullanılmalıdır (Czubasiewicz ve diğerleri, 2017). Erken tanı konulup tedavi edilmediği takdirde hastalığa neden olan bakteri lenfatik sistem veya kan yoluyla eklemlere, sinir sistemine ve kardiyovasküler sisteme yayılabilmektedir. Fark edilerek tedaviye alınan şüpheli olgularda antibiyotiklerin etkisi nedeniyle antikorların ELİSA testi ile tespit edilememesi, testin sonucunun negatif olması ilerleyen dönemlerde olguların takip edilememesine neden olmaktadır. CDC tanı kriterlerine göre ELİSA negatif olarak bulunan olgulara doğrulama testi olan WB testinin maliyet etkinliği nedeniyle uygulanamaması birçok olgunun erkenden belirlenememesine neden olmaktadır (Aucott ve diğerleri, 2009; Halperin, 2018a; Steere ve diğerleri, 2016).

Çalışmamızda yer alan olgular *B.burgdorferi* ELİSA (NovaTec Immunodiagnostica GmbH, Germany) ve recomLine *B.burgdorferi* IgG WB (Mikrogen, Neuried, Germany) testleri yönünden değerlendirildiğinde 11'i ECM, 2'si LA ve 2'si LNB olmak üzere toplam 15 olgumuz *Borrelia* ELİSA IgG testi yönünden negatif bulunmuştur. Antikor bazlı testlerin duyarlılığı enfeksiyonun süresi ile artmakta, enfeksiyonunun başlangıcında yeterli antikor seviyesine ulaşamamaktadır. Bu nedenle Lyme tanısında erken dönemde bakılan ELİSA testlerinin negatif olması

hastaların tanısını geciktirmektedir (Marques, 2015). ELİSA IgG testlerimizin negatif bulunması bu durum ile açıklanabilir. ELİSA IgM testinin yalnızca 5 olgumuzda pozitif saptanması ve bu olguların 4'ünün ECM yalnızca birinin LA olgularına ait olması literatür ile uyumlu (Aguero-Rosenfeld ve diğerleri, 1996; DePietropaolo, Powers, Gill ve Foy, 2005; Glatz, Golestani, Kerl ve Müllegger, 2006) olarak erken dönem seropozitifliğini göstermektedir. Lyme hastalığı tanısı için “two-tier test” algoritmasının kullanılması altın standart bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Halperin, 2018a). Ancak ticari kitlerinde kullanılan antijenlerdeki farklılıklar, mevcut serolojik testlerin kalitesi, farklı testlerin yapılması sonrası yapılan yorumlar (Best ve diğerleri, 2019; Dickeson ve diğerleri, 2016) *Borrelia* tanısını yeniden ele almak gerektiğini düşündürmektedir. Olgularımızda ELİSA IgG test sonuçları 30 olgunun 15'inde negatif 3'ünde ise greyzon olarak tespit edilmiştir. Ancak çalışmamıza dahil edilme kriterleri doğrultusunda olguların semptom göstermesi sebebiyle olgulara WB testi de yapılmıştır. Tüm olguların WB testi pozitif bulunmuştur.

Çalışmamızda kullanılan ELİSA kitlerinin (*B.burgdorferi* sensu stricto, *B.garinii*, *B.afzelii*, OspC 22kDa (*B.burgdorferi* sensu stricto strain B31), p100 (*B.afzelii*), p18 (*B.afzelii*), 20047 ve T25 (*B.garinii*), Flagellin p41i (*B.garinii*)) antijenlerinden, WB kitlerinin ise (p100/83, VlsE, p58, Fla/p41, BmpA/p39, OspC, OspA ve p18) gibi rekombinant antijenler içeren yüksek duyarlılıkta olduğu kanıtlanmış kitlerden (Kadkhoda ve Gretchen, 2018) olmasına dikkat edilmiştir. WB testlerinde ELİSA testinin aksine pozitif bantların bulunması endemik bölgelerde seronegatiflik olsa bile WB testinin yapılması gerektiğini düşündürmektedir. Özellikle çalışmamızda kullanılan recomLine *Borrelia* IgG WB testi içerisinde yer alan spesifik rekombinant protein antijenlerinin bazılarında pozitif bantların görülmesi dikkat çekicidir. Olgularımızda göze çarpan p100/83, VlsE, p58, Fla/p41, BmpA/p39, OspC, OspA ve p18 bantlarının her biri farklı özellikler taşımaktadır. Bilindiği gibi plazmidler üzerinde kodlanan OspC'ye karşı antikorlar, *Borrelia* enfeksiyonlarının tespiti için kullanılan en önemli serolojik belirteçlerdir. Çünkü OspC, kene teması sonrasında olguların erken döneminde *B.burgdorferi*'nin yüzeyinde eksprese edilen başlıca lipoproteinlerden biridir. *B.burgdorferi*'nin enfeksiyon oluşturabilmesi için OspC gereklidir. Tanıda kullanılan ve *B.burgdorferi*'yi tespit eden ELİSA ve WB tanı kitleri içerisinde yer alan önemli proteinlerden birisidir (Carrasco ve diğerleri, 2015; Grimm ve diğerleri, 2004; Halperin, 2018a). Tüm olgularımızda OspC bant pozitifliğine

rastlanmıştır. Bu durum kene beslenmesi sırasında eksprese edilmeye başlayan OspC'nin hem akut hem de kronik dönemde pozitif olabileceğini ayrıca çalışmamızda kullandığımız ELİSA ve WB kitlerimizin *B.burgdorferi*'ye özgü antijenlerin yanı sıra *B.afzelii* ve *B.garinii* gibi Lyme hastalığına daha az neden olan türlere ait antijenlerde içeriyor olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

İntegral dış proteinlerden kromozomal bir protein olan p58'in *Borrelia* için oldukça spesifik olduğu ancak işlevinin henüz aydınlatılamadığı ve *B.burgdorferi* dışında *B.garinii* türlerinde de saptandığı bu türün de nörotropik olduğu bilinmektedir. (Comstedt, Jakobsson ve Bergström, 2011; Lipsker ve Jaulhac, 2009). LA olgularımızın hiçbirinde saptanmayan, ECM olgularımızın yalnızca birinde, LNB olgularımızın ise 6'sında saptanan p58 pozitifliği, p58'in LNB olgularında daha duyarlı bir serolojik belirteç olabileceğini akla getirmektedir. ECM ve LA olgularında saptanmayan LNB olgularımızın 7'sinde pozitif olarak saptanan p100/p83 antijeni ise *B.burgdorferi* dışında *B.afzelii* türlerinin serolojik tanısında değerlendirilen bir proteindir (Rauer, Kayser, Neubert, Rasiah ve Vogt, 1995). Kaiser ve diğerlerinin (1999) 83 LNB olgusunda (67 akut, 16 kronik) rekombinant borrelial antijenlerinin serolojik tanıdaki avantajlarının değerlendirildiği bir çalışmada p100/p83 kronik olgularda akut olgulara göre daha fazla tespit edilmiştir. Bazovska ve diğerlerinin (2001) hem çalışmamızda kullandığımız recomline *Borrelia* IgG kitine benzer "recomBlot *Borrelia* IgG (Mikrogen, Neuried, Germany)" kiti hem de başka bir WB kiti ile LNB olgularında yapılan çalışmada her iki kitte de p100/p83 pozitifliği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre p100/p83 proteini Lyme hastalığının geç dönemini gösteren bir belirteç olarak kabul edilebilir. BmpA/p39 ise *Borrelia* için oldukça spesifik olduğu bilinen kene ısırması/kene teması sonrasında birkaç hafta sonra pozitifleşen antijenlerden biridir. BmpA/p39 genellikle artrit olgularında gözlenen semptomlar ile ilişkilendirilmiştir (Jovanovic ve diğerleri, 2015). *B.afzelii* kaynaklı Lyme hastalığında WB tekniklerinin incelendiği başka bir çalışmada ise BmpA/p39 güçlü bir immünojen yapısının olduğu ve erken Lyme hastalığında serolojik tanı için kullanılabileceği bildirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2013). Sonuçlarımızda BmpA/p39 pozitifliğinin LA (6'sında) ve LNB olgularında (3'ünde) ECM (9'unda) olgularına göre daha az görülmesinin nedeni bu olguların geç dönemde gelmesi ve/veya geç dönem Lyme olarak tanımlanmasından dolayı olabilir. ECM olgularının 9'unda BmpA/p39 pozitifliğinin saptanmış olması erken dönemde ECM'nin oluşmadığı, seronegatif

ancak semptom olan olgularda WB testi ve bu antijenin pozitif bulunması hastalığın süresi hakkında klinisyene bilgi verebilecek bir belirteç/göstergeç olabilir. Bu konuda örneklem sayısının fazla olduğu detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

B.burgdorferi virölans için kritik önemi olan DbpA/p17 ve DbpB/p18 adlı iki tür adezine sahiptir. Lyme tanısında DbpA/p17 ve DbpB/p18'in, Asya ve Avrupa'da kullanılan kitlerde hedef antijenler arasında yer alması düşünülmüştür. Ancak kitler içerisinde yer alan farklı türlere (*B.afzelii*, *B.garinii* gibi) ait antijenlerin varlığı, serolojik tanıda özellikle DbpB/p18'in fonksiyonunun ne olduğunun tam olarak anlaşılamamasına neden olmuştur (Arnaboldi, Sambir ve Dattwyler, 2014). ECM olgularının hiçbirinde saptanmayan DbpB/p18 LNB olgularının 3'ünde, LA olgularının ise 1'inde pozitifliği. Erken dönemde (ECM) saptanmayan ancak geç dönem olarak düşünülen LA ve LNB olgularında az sayıda da olsa pozitifliği saptanan DbpB/p18 proteini hakkında daha fazla veriye ihtiyaç olabileceği düşünülmektedir. Fla/p41 bandının spesifikliği belli olmamasına rağmen flagellalı/kamçılı bakteriler veya diğer spiroketler ile çapraz reaksiyon verebilmektedir (Izac ve diğerleri, 2019). Bu durum olgularımızın yalnızca birinde saptanan ve bu olguda grip benzeri semptomlar, idrarda yanma şikâyetlerinin olması p41'in pozitifliğinin başka bir spiroket enfeksiyonundan ve/veya kamçılı bir bakteriyel enfeksiyonun varlığının olabileceğini akla getirmektedir. *B.burgdorferi*'ye spesifik olan VlsE, özellikle erken belirtiler sırasında (ECM ve akut LNB) Lyme hastalığının teşhisi için değerlidir. *B.burgdorferi*'nin korunmuş VlsE bölgesi, sekonder immün yanıtta ortaya çıkan IgG'ye karşı borelyoz tanısı için yüksek duyarlılık gösteren majör antijenlerden biridir (Bankhead, 2016; Goettner ve diğerleri, 2005). İmmün yanıtta kaçışta da önemli bir rolü olan VlsE'nin spiroket kaynaklı enfeksiyonu veya reenfeksiyonu önlemek için kullanılacak aşı çalışmalarında yer alabilecek etkin bir antijen olduğu düşünülmektedir (Bankhead, 2016). ECM olgularımızın 12'sinde, LA olgularımızın 2'sinde ve LNB olgularımızın ise tamamında VlsE bantlarında pozitiflik saptanmıştır. VlsE'nin, gelecekte Lyme hastalığı tanısı üzerine yapılacak çalışmalarda mutlaka yer alması gereken oldukça hassas ve *B.burgdorferi* için spesifik bir antijen olduğu düşünülmektedir. Avrupa'dan temin edilen tanı kitlerinde *B.burgdorferi* dışındaki *Borrelia* türlerinden (*B.afzelii*, *B.garinii* gibi) elde edilen VlsE'lerin serolojik testler içinde yer alıp almamasının belirlenmesi gerekmektedir. Bunun için ileri dönemlerde yapılacak çalışmalar

borelyozun serolojik tanısına fayda sağlayarak bilime katkı sağlayacaktır (Bankhead, 2016).

Ülkemizde *B.burgdorferi* seropozitifliğinin değerlendirildiği çalışmalara bakıldığında Lyme hastalığı üzerine yapılmış az sayıda çalışmanın olduğu görülmektedir. Lyme seroprevelansı üzerine yapılmış çalışmaların WB sonuçları ile çalışmamızın sonucunda elde edilen sonuçlar kıyaslandığında çalışmalarda WB sonuçları genellikle pozitif veya negatif olarak verilmiş tekil WB bant pozitiflikleri değerlendirilmemiştir (Cikman ve diğerleri, 2018; Parlak, Bayram, Çikman, Ceylan, ve Berktaş, 2015; Rad ve Hekimler, 2007). Akar ve diğerlerinin (2019) *B.burgdorferi* prevelansına baktıkları bir başka çalışma güncel olmasına rağmen WB sonuçları yine tekil bant pozitiflikleri yönünden ele alınmamıştır. Bucak ve diğerleri (2016) tarafından Bolu ili ve ilçelerinde yapılan prevelans çalışmasında yine rekombinant antijen içeren farklı bir WB kiti kullanılmış olsa da sonuçlarda tekil WB bant pozitiflikleri değerlendirilmiştir. Çalışmada tıpkı bizim çalışmamızda olduğu gibi VlsE başta olmak üzere OspC, DmpA/p39, p100/83 bant pozitifliklerinin olduğu görülmüştür. Çalışmamız kene yönüyle endemik bir bölge olan Bolu ilinde tanısı konulamayan, kene öyküsü olsun/olmasın semptom gösteren olgularda *Borrelia* enfeksiyonunu aklımıza getirmemizin önemini öne çıkarmaktadır.

Spiroketler ve/veya spiroketal antijenler tarafından tetiklenen inflamasyonun, hastalığın patogenezi düşünüldüğünde hem erken hem de geç dönemlerde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle patojen ve konak etkileşimi söz konusu olduğunda inflamatuvar mekanizmaların belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu mekanizmaların ortaya çıkarılması yeni, ucuz ve erken tanı teknikleri için hedef oluşturabilecek, uygun tedavilerin geliştirilmesine yardım edebilecek hatta farklı hastalıklar için bile umut olabilecek biyobelirteçlerin tanımlanabilmesini sağlayacaktır (Badawi, 2017).

Lyme hastalığı ve *Borrelia* cinsi ile ilgili günümüze kadar birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir. Farklı sitokin ve kemokin konsantrasyonlarının tanıdaki rolü üzerine yapılan çalışmalar olsa da özellikle kemokinlerin tanıda kullanılabileceğine ait veriler sınırlıdır. Bu nedenle çalışmamızdan elde edilecek verilerin tanıda kullanılabilecek yeni belirteçlerin bulunmasına katkı sağlayacağı

düşünülmektedir. Çalışmamızda Lyme tanısı almış olguların sitokin ve kemokin profillerini araştırabilmek için hastalardan elde edilen periferik kan örneklerinden izole edilen mononükleer hücrelerin kültürü yapılarak rOspC ile uyarımın ardından 24, 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeylerinin değerlendirilmesi ve böylelikle erken tanıda yer alabilecek bir parametre belirlenebilmesi amaçlandı. Çalışmamız içerisinde yer alan MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11 gibi inflamatuvar kemokinler ağırlıklı olarak IFN- γ tarafından indüklenen ve CXCR3 adlı reseptörü paylaşan mediyatörlerdir. IFN- γ tarafından indüklenen CXCR3 kemokinler birbirleri ile homoloji gösterirler. Bunlar endotel hücreleri, astrositler, keratinositler ve fibroblastlar da dahil olmak üzere farklı hücreler tarafından üretilirler (Cole ve diğerleri, 1998; Metzemaekers ve diğerleri, 2018). MIG/CXCL9 sıklıkla PBMC'ler hatta özel olarak makrofajlar, I-TAC/CXCL11 astrositler, IP-10/CXCL10 ise T hücreleri ve monositler tarafından da sekrete edilirler (Metzemaekers ve diğerleri, 2018). MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ile CXCR3 ekseninin kanser terapisi üzerindeki potansiyel rolü, insan immün yetmezlik virüsü (HIV)'in primer enfeksiyonu üzerindeki etkisi gibi farklı enfeksiyon hastalıkları, akut inflamasyon, otoimmünite ve kanserlerde rol almaları nedeniyle klinik çalışmalar ve araştırmalarda öne çıkmaktadır (Arger ve diğerleri, 2020; Tokunaga ve diğerleri, 2018; Yin ve diğerleri, 2019). Son yıllarda artış eğilimi gösteren nörodejeneratif hastalıklar üzerinde CXCR3 reseptörünün rolünün araştırılması (Koper ve diğerleri, 2018; Zhou ve diğerleri, 2019) dahil edilen olgular arasında LNB olgularının yer alması bu kemokinlerin çalışma için seçilmesine neden olmuştur. Farklı semptomlar göstermesi, birçok hastalığı taklit edebilmesi nedeniyle 1998 yılında Akins ve diğerleri (1998) tarafından hastalık için deneysel hayvan modeli oluşturulmak istenilse de günümüzde bilinen spesifik bir insan Lyme modeli olmamasından dolayı çalışmalar klinik olgulardan elde edilen örnekler ile çalışılmaktadır.

Çalışmamızda kene ile temas sonrasındaki ilk 24 saat içerisinde spiroketlerin aktive olması temel alınarak (Cook, 2015; Piesman, Mather, Sinsky ve Spielman, 1987) özellikle tanı kitlerinde yer alan *Borrelia* türlerine spesifik OspC'nin rekombinan formu rOspC ile PBMC'ler uyarıldı. Uyarım sonrasında süpernatantlar 24-48-72 saat aralıklarında toplanarak sitokin ve kemokin düzeylerine bakıldı. Daha önce yapılan in vitro çalışmalarda (des Vignes ve diğerleri, 2001; Piesman ve diğerleri, 1987) 24

ve 48. saatler ile 48 ve 72. saatler tercih edilmiştir. İn vivo yapılan bir çalışmada ise enfeksiyon kinetiğinin değerlendirilmesi için hem fareler *Borelia* ile enfekte edilmiş hem de nimf ve yetişkin kenelerin enfekte fareler ile beslenmesi sağlanmıştır (Sertour ve diğerleri, 2018). Bu çalışma sonucunda kene ile temas sonrası en erken 12 saat sonra *Borrelia* aktarımının olabileceği bu nedenle kenelerin hızlıca vücuttan uzaklaştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır (Sertour ve diğerleri, 2018). Yapılan çalışmalarda *Borrelia* enjeksiyonu ve/veya bakteriye ait verilebilecek proteinlerin (rOspC gibi) hangi saat aralıklarında verileceğine dair herhangi bir standardın olmamasından dolayı, bizim çalışmamızda da literatürlerden elde edilen bilgilere göre en uygun zaman dilimlerinin 24-48-72 saat aralıklarında süpernatant toplanması yönünde olabileceği ön görülmüştür.

Bugüne kadar *B.burgdorferi* ve Lyme hastalığı ile ilgili yapılan sitokin ve kemokin çalışmalarının çoğunluğunda serum ve/veya BOS örneklerinde ölçüm yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda Lyme hastalığı farklı klinik tutulumlara sahip olmasına rağmen bu farklı klinik tutulumların yalnızca biri veya ikisine sahip olan olgulardan elde edilen örneklerde ölçümler yapılmıştır (Cerar ve diğerleri, 2013; Pietikainen ve diğerleri, 2016; Skogman ve diğerleri, 2020). *B.burgdorferi* ve PBMC ile ilgili yapılan ilk çalışma 1993 yılında Schempp ve diğerlerinin (1993) Lyme tanısı almış 5 olguda *Borrelia* alt türü ile T hücre proliferasyonu ve granülosit monosit koloni uyarıcı faktörün (GM-CSF) salınımının karşılaştırıldığı çalışmadır. Ardından Giambartolomei ve diğerlerinin (1998) IL-10 düzeylerini araştırdıkları PBMC'lerin uyarımı söz konusudur. Jansky ve diğerlerinin (2003) LPS ve canlı *Borrelia* ile uyarılan PBMC'lerde sitokinlerin dinamiklerinin incelendiği başka bir çalışmada sınırlı sayıda sitokin değerlendirilmiş ancak yine kemokinler üzerinde herhangi bir değerlendirme yapılmamıştır.

Lyme hastalığı, sitokinler ve kemokinler üzerine yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde ise, Lyme borelyozun deride oluşturduğu lezyonlara göre akut (eritema kronikum migrans (ECM)), subakut (borelial lenfositoma (BL)) ve kronik (akrodermatit kronika atrofikans (ACA)) olmak üzere 100 olgu ve 25 kontrolden oluşan grupta kemokin, sitokin ve lökosit belirteçleri mRNA ekspresyonu ile tanımlanmıştır (Müllegger ve diğerleri, 2007). Özellikle ECM ve ACA'lı olgularda MIG/CXCL9 ve IP-10/CXCL10'un yüksek mRNA ekspresyonuna sahip olduğu, BL'li

olgularda da kemokin ligand 13 (CXCL13) mRNA ekspresyonunun yüksek olduğu gözlenmiştir. Çalışmada ayrıca ECM ve ACA olgularında T hücreleri ve MIG/CXCL9, BL'li olgularda ise CXCL13 varlığı immünohistokimyasal yöntem kullanılarak doğrulanmıştır. Ancak bu çalışmada LA ve LNB'li olgular incelenmemiştir (Müllegger ve diğerleri, 2007). ECM'li olguların deri lezyonlarında MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11'in bir arada makrofaj aktivasyonu ile ilişkilendirildiği bir çalışmada makrofaj aktivasyonu ile ilişkili olan bu kemokinlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin indüklendiği gözlenmiştir. Bu çalışmada da yine LA ve LNB olguları değerlendirilmeye alınmamıştır (Jones ve diğerleri, 2008).

Üç farklı klinik tutulumun bir arada olup, değerlendirildiği bir çalışma literatürde, bilginiz dâhilinde mevcut değildir. Bu nedenle bu tez çalışmasında Lyme borelyoz olguları üç farklı tutulum olarak (ECM, LA ve LNB) ele alınmıştır. Lyme yönünden seronegatif olarak belirlenen sağlıklı bireyler de çalışmaya dahil edilerek ve MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 ve IFN- γ düzeylerine PBMC'lerin rOspC ile uyarımı sonrasında elde edilen süpernatantlarında bakılmıştır. Çalışmamızda ECM olguları ve kontrol grubunun PBMC'lerinin rOspC ile uyarımı sonrası 24, 48 ve 72. saatlerdeki MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11 düzeyleri arasından yalnızca IP-10/CXCL10 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Kemokinler inflamatuvar hücrelerin enfekte dokulara yönlendirilmesinde önemli bir rol oynar. Oluşan immün yanıt ile aktive edilmiş T hücreleri CXCR3'ü artırır. Th1 hücreleri tarafından üretilen IFN- γ , makrofajların güçlü bir uyarandır ve CXCR3 için ligand olan MIG/CXCL9 ve IP-10/CXCL10 gibi IFN- γ 'nın indüklediği kemokinleri inflamasyonun olduğu bölgeye çekmektedir. Lyme hastalığı ile yapılan çalışmalar (Glickstein ve diğerleri, 2003; Salazar ve diğerleri, 2003), *B.burgdorferi*'nin esas olarak Th1 tipi bir immün yanıtı indüklediğini, bunun da monosit/makrofaj aktivasyonu ile ilişkili sitokinlerin ve kemokinlerin salgılanmasına yol açtığını göstermektedir. MIG/CXCL9 ve IP-10/CXCL10 CD4+ T hücrelerinin efektör Th1/Th17 hücrelerine polarizasyonunu indüklerken, I-TAC/CXCL11 T hücre polarizasyonunu düzenleyici T hücreler olarak bilinen Treg'lerin fenotipine yönlendirir (Salazar ve diğerleri, 2003). ECM olgularının deri lezyonlarından alınan örneklerde yapılmış transkriptom analizi içeren güncel bir çalışma ECM olgularında IFN- γ ilişkili MIG/CXCL9 ve IP-10/CXCL10 düzeyinin yüksekliğini desteklemektedir (Marques ve diğerleri, 2018). ECM lezyonlarının,

konak savunmasında ve ayrıca immün modülasyonunda yer alan önemli düzenleyici faktörleri içeren IFN- γ ile ilişkisi ortaya konulmuştur. Çalışmada *B.burgdorferi*'nin neden olduğu erken kutanöz Lyme hastalığının immünopatogeneze yeni bakış açıları sağlandığı ve ilerleyen dönemlerde yapılacak çalışmalarda birden fazla hedefin olması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır (Marques ve diğerleri, 2018). Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla da paralellik gösteren çalışmamızda ECM olgularında PBMC'lerin rOspC ile uyarımı sonrasında kontrol grubuna göre ilk 24 saatte artan IP-10/CXCL10'un incelediğimiz diğer kemokinlere göre daha hassas olduğunu belirledik. Sonuçlarımıza göre daha fazla örneklem sayısının yer aldığı yeni çalışmalar ile IP-10/CXCL10'un Lyme hastalığı için erken dönemde ele alınabilecek serolojik bir belirteç olabileceği söylenebilir.

Artritli olguların eklem sıvıları ve sinoviyal dokularında kemokin ve sitokinlerin antibiyotik tedavisi öncesi ve tedavi boyunca karşılaştırıldıkları bir çalışmada olgular takip edildiğinde hastalık boyunca sinoviyal sıvılarında özellikle MIG/CXCL9 ve IFN- γ 'nın yüksek olduğu, bu nedenle antibiyotik kullanımının enfeksiyonu azaltsa bile sinoviyumdaki inflamatuvar yanıtın en azından belli bir süre daha devam edeceği sonucuna ulaşılmıştır. Ancak *B.burgdorferi*'nin bu sitokinlerin salgılanmasını nasıl uyardığı netliğe kavuşturulamamıştır (Shin, Glickstein ve Steere, 2007). Aynı araştırmacılar üç yıl sonra yaptıkları farklı bir çalışmada *B.burgdorferi* ile enfeksiyonun monositlerin/makrofajların kemokin ligandları (MIG/CXCL9 ve IP-10/CXCL10 gibi) salgılamak için nasıl uyardığını ortaya çıkarmayı amaçlamışlardır. Bunun için artritli 24 olgunun periferik kan (PBMC) ve sinoviyal sıvılarından (SFMC) elde edilen mononükleer hücrelerini *B.burgdorferi*'nin farklı iki suşu (EM70, OspC tip A) ile ayrı ayrı, yalnızca IFN- γ ve hem *B.burgdorferi* hem de IFN- γ ile 4-120 saat aralıklarında uyarmışlardır. Uyarım sonrasında kemokin salınımına bakılan bu çalışmada *B.burgdorferi*'nin olgularda doğal ve adaptif immün yanıtların meydana gelebilmesi için doğrudan ve dolaylı olarak monositleri/makrofajları uyardığını tespit etmişlerdir. Canlı *B.burgdorferi* ile uyarılan bu çalışmada özellikle MIG/CXCL9 ve IP-10/CXCL10 düzeylerine bakılmış ve yüksek oldukları tespit edilmiştir (Shin, Strle, Glickstein, Luster ve Steere, 2010). Shin ve diğerlerinin (2010) çalışmasında olduğu gibi bizim çalışmamızda da LA olgularında kontrol grubuna göre MIG/CXCL9 ve IP-10/CXCL10 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Shin ve

diğerlerinin (2010) yaptığı başka bir çalışmada hücre toplama zamanlamasının, PCR sonuçlarının ve donma süresinin ex vivo olarak kemokin salgılanmasında farklılığa neden olmadığı da belirtilmiştir. Çalışmamıza dâhil edilen LA olgularımızın eklem sıvılarında Lyme PCR testine bakılmamıştır; bu çalışmamızın zayıf yönlerinden biridir, ancak olgular Lyme serolojisi pozitif ve tedaviye cevap veren olgular olduğu için MIG/CXCL9 ve IP-10/CXCL10'un LA için ön bir belirteç olabileceği düşünülebilir. Özellikle ECM ve LNB olgularında da kontrol grubuna göre ilk 24 saate göre artan IP-10/CXCL10 Lyme tanısının erken döneminde ön plana çıkabilecek bir kemokin olarak değerlendirilebilir.

Nöroborelyozun yer aldığı nörodejeneratif hastalıklar ele alındığında MSS'deki inflamasyonda kemokinlerin rollerinin araştırıldığı çalışmaların ele alındığı bir derlemede IP-10/CXCL10'un lökositlerin göçüne aracılık etmede merkezi bir rol oynadığı belirtilmiştir. Bu kemokin ve reseptörü olan CXCR3'ün işlevini etkili bir şekilde bağlayan ve bloke eden ajan geliştirildiği ancak konu ile ilgili daha ileri çalışmalar gerektiğine dikkat çekilmiştir (Michlmayr ve McKimmie, 2014). Müller ve diğerlerinin (2010) yazdığı bir başka derlemede CXCR3 ve MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11 ligandları nöroinflamatuvar hastalıklarda değerlendirilmeye alınmış, özellikle LNB'de IP-10/CXCL10'un BOS örneklerindeki artışı ve I-TAC/CXCL11 düzeyinin BOS'da tespit edilebileceği belirtilmiştir. LNB'li olgularda IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11'in de yer aldığı bazı kemokinlerin değerlendirilmesinin yapıldığı bir çalışmada erken LNB'li hastalarda tedavi öncesi serum ve BOS IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir (Moniuszko ve diğerleri, 2014). LNB'li olguların BOS örneklerinde yapılan çalışmalarda MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 ve I-TAC/CXCL11'in düzeylerinde artış gözlenmiştir. Ancak LNB ve BOS örneği söz konusu olduğunda tanıda önemli bir yere sahip CXCL13'ün diğer kemokinlere göre LNB için daha önemli bir marker olduğu vurgulanmıştır (Henningsson, Lager, Brännström, Tjernberg ve Skogman, 2018; Pietikainen ve diğerleri, 2016; Skogman ve diğerleri, 2020). Ayrıca LNB olgularında eş zamanlı alınan serum ve BOS örneklerinde Lyme antikor indeksinin önemli olduğu bilinmektedir. BOS örneklerindeki antikor düzeyinin serum örneklerindeki antikor düzeylerine oranı anti-Borrelia antikor indeksi olarak bilinmektedir ve intratekal antikor yapımının olduğunu göstermektedir. BOS örneklerinde serum örneklerine göre yüksek oranda antikor saptanması

enfeksiyonunun MSS'nde olduğunu göstermekte ve LNB tanısını kesinleştirmektedir. Bu nedenle serum antikor pozitifliği olmayan Lyme borelyoz şüpheli olguların BOS örneklerinde de serolojik olarak antikor pozitifliği olup olmadığına bakılması ve antikor indeksinin belirlenmesi önerilmektedir (Theel ve diğerleri, 2019). Çalışmamıza dahil edilen LNB olgularımızın tıbbi geçmişleri, klinik, radyolojik bulguları, serumlarında bakılan Lyme antikor pozitiflikleri ve tedavi ile düzelmeleri LNB tanısını doğrulamaktadır.

Bizim çalışmamızda da LNB olgularının ve kontrol grubunun rOspC ile uyarımı sonrası ilk 24 saatte kontrol grubuna göre IP-10/CXCL10'un yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her üç klinik tutulumda (ECM, LA, LNB) da kontrol grubuna göre ilk 24 saate istatistiksel olarak anlamlı yüksek fark bulunan IP-10/CXCL10'un Lyme hastalığında daha yaygın olarak araştırılması gerektiğini göstermektedir. Monositler ve nötrofiller tarafından sentezlenen IP-10/CXCL10 inflamasyon bölgesine aktif T lenfositlerin toplanmasına neden olur. Ayrıca IP-10/CXCL10 astrositler tarafından da üretilir ve bu da onun MSS içindeki inflamatuvar süreçlerde rol aldığı göstermektedir (Petkovic ve diğerleri, 2004). Lyme borelyozlu olguların hem serum hem de BOS örneklerinde mononükleer hücrelere etki eden kemokin düzeyine bakılan bir çalışmada IP-10/CXCL10 düzeyinin BOS örneklerinde belirgin bir şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir (Grygorczuk ve diğerleri, 2005). Th1 ilişkili olan IP-10/CXCL10 Lyme olgularında önemli pro-inflamatuvar faktörlerden biri olabilir ve olgular için klinik ve klasik olarak önerilen serolojik belirteçlere destek bir belirteç olabileceği düşünülmektedir.

IFN- γ düzeylerine bakıldığında ise olgu ve kontrol grupları arasından ECM ve LNB olgularında saatler arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ancak LA'lı olgular ile kontrol grubu karşılaştırıldığında IFN- γ 'nın her üç saat aralığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. İlk 24 saatte olgularda, 48 ve 72.saatte de kontrol grubunda IFN- γ düzeyinin yüksek olduğu görülmüştür. Bunun nedeni *B.burgdorferi*'ye ait proteinlerin uyarım sonrası önemli miktarda IFN- γ salgılanmasına neden olduğu ilerleyen zamanlarda bu salınımın azaldığı ile açıklanabilir. Ayrıca LA olgularından elde edilen hücrelerin rOspC uyarımından sonraki ilk 24 saatte IFN- γ 'nın yüksek olması hastalık etiyolojisi, artrit süresi ve

patojenik mekanizmalardaki değişkenlikler ile ilişkili olabilir. Enfeksiyöz bir ajanla karşılaşıldığında uyarım sonrası belirgin bir IFN- γ artışı olabilir.

Şimdiye kadar PBMC'lerin uyarımı ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda farklı uyarımlarla değerlendirme yapılmıştır. Çalışmamızdan elde edilen veriler arasındaki farklılıkların PBMC'lerin direkt olarak mikroorganizmanın kendisi veya çalışmamızdaki gibi oldukça spesifik bir protein olan rOspC ile uyarım farkından kaynaklanabileceği, bu gruplar ile birlikte canlı *Borrelia* alt türü ve spesifik birden fazla protein ile uyarım yapılarak daha ayrıntılı moleküler düzeyde çalışmalar yapılması gerektiği düşünölmüştür.

Lyme hastalığı söz konusu olduğunda farklı klinik tutulumların hepsinin bir arada olduğu çalışmaların bulunmaması çalışmamızı özgün kılmaktadır. Çalışmamızda 24-48 ve 72. saatlerde elde edilen sonuçlarımız genel olarak literatür ile uyumludur. Bu veriler doğrultusunda IP-10/CXCL10'un, borelyozda hiçbir klinik tutulumu (ECM, LA, LNB gibi) ayırmadan tanı açısından özellikle dikkate alınması gereken önemli bir belirteç olabileceği düşünölmektedir.

Lyme hastalığının araştırılması için *B.burgdorferi* ve hücre hatlarının kullanıldığı birçok çalışma söz konusudur (Bernardino, Kaushal ve Philipp, 2009; Wang, Petzke, Iyer, Wu, & Schwartz, 2008). Hücre hatlarının sağlıklı kabul ettiğimiz kontrol grubundaki yanıtları ne ölçüde yansıttığını anlayabilmek için farklı ölçüm noktalarındaki düzeyler karşılaştırıldığında insan monosit hücre hattının (U-937) sağlıklı kişileri yansıtmakta daha başarılı olduğunu düşünöyoruz. Benzer çalışmalarda farklı monosit ve makrofaj (fare makrofaj hücresi RAW264.7 ve insan monosit hücresi olan THP-1 gibi) hücre hatları kullanılmış ancak çalışmaların (Bernardino ve diğerleri, 2009; Wang ve diğerleri, 2008) hiçbirinde Lyme hastalığı konusunda çalışmaya dâhil edilen sağlıklı grup için dikkate alınabilecek hücre hattının ne olacağı belirtilmemiştir. Çalışmamızın sonuçlarının bu konuda da bir katkı sağlayacağını söyleyebiliriz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak tez çalışmamız ile,

Lyme hastalığı için yapılacak çalışmalarda alınacak örneklerin iyi belirlenmesi gerekmektedir. Olgulardan elde edilen örnek türünün farklılığı çelişkili sonuçlar elde edilmesine neden olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızın sonucunda ECM için PBMC-serum-deri biyopsisi, LA için PBMC-sinoviyal sıvı-serum, LNB için ise PBMC-serum-BOS örneklerinin eş zamanlı alınacağı daha büyük örneklem sayılarının yer aldığı çalışmaların yapılması gerektiğini önerebiliriz.

Hastanın anamnezine göre kene teması olan veya olmayan Lyme borelyoz şüpheli olgularda özellikle endemik bölgelerde seronegatiflik olsa bile WB ile doğrulama yapılması gerekebilir. ELİSA testine ek olarak olgularda erken dönemde IP-10/CXCL10'un tanıda kullanılmasının klinisyene/kliniğe destek olabileceğinin altı çizilmelidir.

Kene teması olgularında ECM tanısı %80 kesin tanıyı desteklese de kronik dönemlerde özellikle baş ağrısı, ani görme kaybı, unutkanlık, yürümede zorluk, bayılma gibi nörolojik yakınmalar ve/veya şikâyetlerle nöroloji polikliniklerine başvuran olguların LNB açısından değerlendirilmesi ve bu olguların kanında serolojik olarak Lyme antikorunun bakılması gerekir. Özellikle endemik bölgelerde kişi borelyoz ile uyumlu şikâyetler ile başvuruyorsa çoğunlukla başka nörolojik hastalıklar düşünülerek Lomber ponksiyon endikasyonu sonucu alınan BOS örneklerinde de eş zamanlı alınan serum örneklerinde *Borrelia* antikorlarının araştırılması önerilebilir.

Kronik dönemde sık görülen ve tekrarlayan artrit olgularının sinoviyal sıvısında PCR ile Lyme antijeni araştırılması sinoviyal sıvının alınamadığı zamanda kanda Lyme antikorları ve kemokin çalışılması tanı ve tedavide kolaylık sağlayabilir.

Bu çalışma ile Lyme hastalığının erken tanısında kullanılabilecek ve/veya tanıya destek olabilecek bir kemokinin tespiti ileri çalışmalar için umut verici olmuştur.

Son yıllarda Lyme hastalığının farklı klinik tutulumlarında (ECM, LA ve LNB) sitokinler ile birlikte özellikle kemokinlerin rolünün hastalığın tanısı ve tedavisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Olgu grubunun üç farklı klinik alt gruba ayrılarak PBMC elde edilmesi ile IFN- γ ilişkili kemokinlerin bir arada değerlendirildiği bu tez çalışması sayesinde hastalık hakkında patogeneze, immünoloji ve farklı klinik tutulumlara yol açan mekanizmalarının birlikte incelenmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Bugüne kadar Lyme hastalığı ile ilgili pek çok çalışma yapılmış, ancak ülkemiz genelinde Lyme hastalarının kanlarından mononükleer hücre izolasyonu yapılarak kemokinler üzerinde elde edilen herhangi bir veri ortaya konulmamıştır. Çalışmamızdan elde edilen veriler sayesinde tedaviye yönelik güncel araştırmalara ışık tutulması hedeflenmektedir.

İlerleyen dönemlerde örnek sayısının artırılarak hastalığın yine üç klinik tutulum biçiminin (ECM, LA ve LNB) de bir arada olduğu daha geniş bir sitokin profilinin değerlendirileceği çalışmalar yapılması gerekmektedir. Kemokinler ile birlikte interlökinlerin daha geniş bir profil içinde ele alınması ve ilişkili korelasyonların veya nedenselliklerin ortaya çıkarılması Lyme konusunda çalışan bilim insanlarının ortaklaştığı bir alan oluşturmaktadır. Bizim çalışmamız da hem hastalık tanısı için potansiyel yeni belirteçlerin belirlenmesi hem de hastalığın patogenezinin daha ayrıntılı olarak resmedilmesi için belirli veriler sunmaktadır.

İleri çalışma planlarında sağlıklı gönüllülerde gözlenebilen bireysel farklılıkların giderilmesi amacıyla hücre dizileri ile çalışma planlanabilir; biz bu sonuçlarımız ile insan monosit morfolojisini incelemek amacı ile evrensel olarak kullanılan U-937 hücre dizisinin Lyme antijenleri (rOspC) ile uyarıma uygun bir model olduğunu düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pillai, S. (2019). *Basic Immunology E-Book: Functions and Disorders of the Immune System*. New York US: Elsevier Health Sciences, 122, 217.
- Aguero-Rosenfeld, M. E. (2008). Lyme disease: laboratory issues. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 301-313.
- Aguero-Rosenfeld, M. E., Nowakowski, J., Bittker, S., Cooper, D., Nadelman, R. B., and Wormser, G. P. (1996). Evolution of the serologic response to *Borrelia burgdorferi* in treated patients with culture-confirmed erythema migrans. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(1), 1-9.
- Aguero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I., and Wormser, G. P. (2005). Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), 484-509.
- Akar, N., Çalışkan, E., Öztürk, C. E., Ankarali, H., Kılınçel, Ö., Öksüz, Ş., and Şahin, İ. (2019). Seroprevalence of hantavirus and *Borrelia burgdorferi* in Düzce (Turkey) forest villages and the relationship with sociodemographic features. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 49(2), 483-489.
- Akins, D. R., Bourell, K. W., Caimano, M. J., Norgard, M. V., and Radolf, J. D. (1998). A new animal model for studying Lyme disease spirochetes in a mammalian host-adapted state. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(10), 2240-2250.
- Ank, N., West, H., Bartholdy, C., Eriksson, K., Thomsen, A. R., and Paludan, S. R. (2006). Lambda interferon (IFN- λ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *Journal of Virology*, 80(9), 4501-4509.
- Arger, N. K., Ho, M. E., Allen, I. E., Benn, B. S., Woodruff, P. G., and Koth, L. L. (2020). CXCL9 and CXCL10 are differentially associated with systemic organ involvement and pulmonary disease severity in sarcoidosis. *Respiratory Medicine*, 161, 105822.
- Arnaboldi, P. M., Sambir, M., and Dattwyler, R. J. (2014). Decorin binding proteins A and B in the serodiagnosis of Lyme disease in North America. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(10), 1426-1436.
- Aslam, B., Nisar, M. A., Khurshid, M., and Farooq Salamat, M. K. (2017). Immune escape strategies of *Borrelia burgdorferi*. *Future Microbiology*, 12(13), 1219-1237.
- Aucott, J., Morrison, C., Munoz, B., Rowe, P. C., Schwarzwald, A., and West, S. K. (2009). Diagnostic challenges of early Lyme disease: lessons from a community case series. *BMC Infectious Diseases*, 9(1), 79.
- Auwaerter, P. G. (2015). *Lyme Disease and Other Infections Transmitted by Ixodes scapularis, An Issue of Infectious Disease Clinics of North America, E-Book* (Vol. 29): Elsevier Health Sciences. 187-210.

- Bachiller, S., Jiménez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., and Boza-Serrano, A. (2018). Microglia in neurological diseases: a road map to brain-disease dependent-inflammatory response. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 488.
- Badawi, A. (2017). The Potential of Omics Technologies in Lyme Disease Biomarker Discovery and Early Detection. *Infectious Diseases and Therapy*, 6(1), 85-102.
- Baid, A. (2016). ELISA-A mini review. *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5, 1-8.
- Bakirci, S. (2016). Prevalence of *Hyalomma aegyptium* (Linnaeus, 1758) on Tortoises (*Testudo graeca*) in Izmir and Aydin Province, Turkey. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 27(1), 5-7.
- Banisadr, G., Rostène, W., Kitabgi, P., and Parsadaniantz, S. M. (2005). Chemokines and brain functions. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 4(3), 387-399.
- Bankhead, T. (2016). Role of the VlsE lipoprotein in immune avoidance by the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics*, 7, 191-204.
- Barbour, A. G., and Benach, J. L. (2019). Discovery of the Lyme disease agent. *mBio*, 10(5), e02166-02119.
- Battisti, J. M., Bono, J. L., Rosa, P. A., Schrumph, M. E., Schwan, T. G., and Policastro, P. F. (2008). Outer surface protein A protects Lyme disease spirochetes from acquired host immunity in the tick vector. *Infection and Immunity*, 76(11), 5228-5237.
- Bazovska, S., Kondas, M., Simkovicova, M., Kmety, E., and Traubner, P. (2001). Significance of specific antibody determination in Lyme borreliosis diagnosis. *Bratislavske Lekarske Listy*, 102(10), 454-457.
- Beard, C. (2014). Lyme disease: Lyme disease prevention and control—the way forward. *Canada Communicable Disease Report*, 40(5), 91.
- Ben-Menachem, G., Kubler-Kielb, J., Coxon, B., Yergey, A., and Schneerson, R. (2003). A newly discovered cholesteryl galactoside from *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7913-7918.
- Benhnia, M. R.-E.-I., Wroblewski, D., Akhtar, M. N., Patel, R. A., Lavezzi, W., Gangloff, S. C., Goyert, S. M., Caimano, M. J., Radolf, J. D., and Sellati, T. J. (2005). Signaling through CD14 attenuates the inflammatory response to *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *The Journal of Immunology*, 174(3), 1539-1548.
- Berende, A., Oosting, M., Kullberg, B.-J., Netea, M. G., and Joosten, L. A. (2010). Activation of innate host defense mechanisms by *Borrelia*. *European Cytokine Network*, 21(1), 7-18.

- Bernard, Q., Thakur, M., Smith, A. A., Kitsou, C., Yang, X., and Pal, U. (2019). *Borrelia burgdorferi* protein interactions critical for microbial persistence in mammals. *Cellular Microbiology*, 21(2), e12885.
- Bernardino, A. L., Kaushal, D., and Philipp, M. T. (2009). The antibiotics doxycycline and minocycline inhibit the inflammatory responses to the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(9), 1379-1388.
- Best, S. J., Tschaeppe, M. I., and Wilson, K. M. (2019). Investigation of the performance of serological assays used for Lyme disease testing in Australia. *Plos One*, 14(4), e0214402.
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845-859.
- Biesiada, G., Czepiel, J., Lesniak, M. R., Garlicki, A., and Mach, T. (2012). Lyme disease: review. *Archives of Medical Science*, 8(6), 978-982.
- Bonilla, F. A., and Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 33-40.
- Borchers, A. T., Keen, C. L., Huntley, A. C., and Gershwin, M. E. (2015). Lyme disease: a rigorous review of diagnostic criteria and treatment. *Journal of Autoimmunity*, 57, 82-115.
- Bouquet, J., Soloski, M. J., Swei, A., Cheadle, C., Federman, S., Billaud, J.N., Rebman, A. W., Kabre, B., Halpert, R., and Boorgula, M. (2016). Longitudinal transcriptome analysis reveals a sustained differential gene expression signature in patients treated for acute Lyme disease. *mBio*, 7(1), e00100-00116.
- Brandt, K. S., Patton, T. G., Allard, A. S., Caimano, M. J., Radolf, J. D., and Gilmore, R. D. (2014). Evaluation of the *Borrelia burgdorferi* BBA64 protein as a protective immunogen in mice. *Clinical and Vaccine Immunology* 21(4), 526-533.
- Brice, G. T., Graber, N. L., Hoffman, S. L., and Doolan, D. L. (2001). Expression of the chemokine MIG is a sensitive and predictive marker for antigen-specific, genetically restricted IFN- γ production and IFN- γ -secreting cells. *Journal of Immunological Methods*, 257(1-2), 55-69.
- Bryksin, A. V., Godfrey, H. P., Carbonaro, C. A., Wormser, G. P., Aguero-Rosenfeld, M. E., and Cabello, F. C. (2005). *Borrelia burgdorferi* BmpA, BmpB, and BmpD proteins are expressed in human infection and contribute to P39 immunoblot reactivity in patients with Lyme disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(8), 935-940.
- Bucak, Ö., Koçoğlu, M. E., Taş, T., and Mengeloğlu, F. Z. (2016). Evaluation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato seroprevalence in the province of Bolu, Turkey. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46(3), 727-732.
- Burgdorfer, W. (1993). The historical road to the discovery of *Borrelia burgdorferi*. In *Aspects of Lyme Borreliosis* (Vol. 11): Springer, 335-338.

- Burrascano, J. (2008). Diagnostic hints and treatment guidelines for Lyme and other tick borne illnesses. *International Lyme Associated Diseases Society*, 16, 1-25.
- Bykowski, T., Woodman, M. E., Cooley, A. E., Brissette, C. A., Wallich, R., Brade, V., Kraiczy, P., and Stevenson, B. (2008). *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface proteins (BbCRASPs): Expression patterns during the mammal–tick infection cycle. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 249-256.
- Cardenas-de la Garza, J. A., De la Cruz-Valadez, E., Ocampo-Candiani, J., and Welsh, O. (2019). Clinical spectrum of Lyme disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(2), 201-208.
- Carrasco, S. E., Troxell, B., Yang, Y., Brandt, S. L., Li, H., Sandusky, G. E., Condon, K. W., Serezani, C. H., and Yang, X. F. (2015). Outer surface protein OspC is an antiphagocytic factor that protects *Borrelia burgdorferi* from phagocytosis by macrophages. *Infection and Immunity*, 83(12), 4848-4860.
- Casjens, S., Palmer, N., Van Vugt, R., Mun Huang, W., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., and Dodson, R. J. (2000). A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, 35(3), 490-516.
- Cerar, T., Ogrinc, K., Lotrič-Furlan, S., Kobal, J., Levičnik-Stezinar, S., Strle, F., and Ružić-Sabljic, E. (2013). Diagnostic value of cytokines and chemokines in Lyme neuroborreliosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(10), 1578-1584.
- Chanput, W., Peters, V., and Wichers, H. (2015). THP-1 and U937 Cells. In *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer, Cham, 147-159.
- Charon, N. W., Cockburn, A., Li, C., Liu, J., Miller, K. A., Miller, M. R., Motaleb, M. A., and Wolgemuth, C. W. (2012). The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annual Review of Microbiology*, 66, 349-370.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., and Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204-7218.
- Christodoulides, A., Boyadjian, A., and Kelesidis, T. (2017). Spirochetal lipoproteins and immune evasion. *Frontiers in Immunology*, 8, 364.
- Cikman, A., Aydin, M., Gulhan, B., Karakecili, F., Demirtas, L., and Kesik, O. A. (2018). Geographical features and seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in Erzincan, Turkey. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 12(4), 378.
- Citera, M., Freeman, P. R., and Horowitz, R. I. (2017). Empirical validation of the Horowitz Multiple Systemic Infectious Disease Syndrome Questionnaire for suspected Lyme disease. *International Journal of General Medicine*, 10, 249-273.

- Clark-Lewis, I., Mattioli, I., Gong, J.H., and Loetscher, P. (2003). Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 289-295.
- Cole, K. E., Strick, C. A., Paradis, T. J., Ogborne, K. T., Loetscher, M., Gladue, R. P., Lin, W., Boyd, J. G., Moser, B., and Wood, D. E. (1998). Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel Non-ELR CXC Chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(12), 2009-2021.
- Comstedt, P., Jakobsson, T., and Bergström, S. (2011). Global ecology and epidemiology of *Borrelia garinii* spirochetes. *Infection Ecology & Epidemiology*, 1(1), 9545.
- Connolly, S. E., and Benach, J. L. (2005). The versatile roles of antibodies in *Borrelia* infections. *Nature Reviews Microbiology*, 3(5), 411-420.
- Control, C. f. D., and Prevention. (2007). Lyme disease--United States, 2003-2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 56(23), 573.
- Cook, M. J. (2015). Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. *International Journal of General Medicine*, 8, 1-8.
- Craig-Mylius, K., Weber, G. F., Coburn, J., and Glickstein, L. (2005). *Borrelia burgdorferi*, an extracellular pathogen, circumvents osteopontin in inducing an inflammatory cytokine response. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(5), 710-718.
- Czubasiewicz, Z., Szewczyk, M., Wiczowski, A., Echolc, B. E., and Mazur, B. (2017). Diagnostic usefulness of some test kits used in detection of *Borrelia burgdorferi*. *Paediatrics and Family Medicine*, 13(1), 108-118.
- DePietropaolo, D. L., Powers, J. H., Gill, J. M., and Foy, A. J. (2005). Diagnosis of lyme disease. *American Family Physician* 72(2), 297-304.
- Dersch, R., and Rauer, S. (2017). Neuroborreliosis-Diagnostics, treatment and course. *Der Nervenarzt*, 88(4), 419-431.
- des Vignes, F., Piesman, J., Heffernan, R., Schulze, T. L., Stafford, K. C., and Fish, D. (2001). Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(5), 773-778.
- Dickeson, D. J., Chen, S. C., and Sintchenko, V. G. (2016). Concordance of four commercial enzyme immunoassay and three immunoblot formats for the detection of Lyme borreliosis antibodies in human serum: the two-tier approach remains. *Pathology*, 48(3), 251-256.
- Dinarello, C. A. (2007). Historical insights into cytokines. *European Journal of Immunology*, 37(S1), 34-45.

- Ditton, H. J., Neuss, M., and Zöller, L. (1992). Evidence that *Borrelia burgdorferi* immunodominant proteins p100, p94 and p83 are identical. *FEMS Microbiology Letters*, 73(3), 217-220.
- Du, L., Zhang, Y., Chen, Y., Zhu, J., Yang, Y., and Zhang, H.L. (2017). Role of microglia in neurological disorders and their potentials as a therapeutic target. *Molecular Neurobiology*, 54(10), 7567-7584.
- Dumic, I., and Severnini, E. (2018). "Ticking Bomb": The Impact of Climate Change on the Incidence of Lyme Disease. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2018.
- Ebady, R., Niddam, A. F., Boczula, A. E., Kim, Y. R., Gupta, N., Tang, T. T., Odisho, T., Zhi, H., Simmons, C. A., and Skare, J. T. (2016). Biomechanics of *Borrelia burgdorferi* vascular interactions. *Cell Reports*, 16(10), 2593-2604.
- Elbaum-Garfinkle, S. (2011). Bicentennial: Close to Home: A History of Yale and Lyme Disease. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 84(2), 103.
- Elsner, R. A., Hastey, C. J., Olsen, K. J., and Baumgarth, N. (2015). Suppression of long-lived humoral immunity following *Borrelia burgdorferi* infection. *Plos Pathogens*, 11(7), e1004976.
- Fallahi, P., Elia, G., and Bonatti, A. (2017). Interferon- γ -induced protein 10 in Lyme disease. *La Clinica Terapeutica*, 168(2), 146-150.
- Feng, W., and Wang, X. (2015). Structure of decorin binding protein B from *Borrelia burgdorferi* and its interactions with glycosaminoglycans. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1854(12), 1823-1832.
- Fikrig, E., Barthold, S. W., Persing, D. H., Sun, X., Kantor, F. S., and Flavell, R. A. (1992). *Borrelia burgdorferi* strain 25015: characterization of outer surface protein A and vaccination against infection. *The Journal of Immunology*, 148(7), 2256-2260.
- Flynn, G., Maru, S., Loughlin, J., Romero, I. A., and Male, D. (2003). Regulation of chemokine receptor expression in human microglia and astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 136(1-2), 84-93.
- Fomenko, N. V., Sabitova Iu, B., Khasnatinov, M. A., Gol'tsova, N. A., Danchinova, G. A., Bataa, Z., Ambed, D., and Stronin, O. V. (2007). Heterogeneity of the gene P83/100 of *Borrelia borrelia burgdorferi sensu lato* complex. *Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologija i Virusologija*(4), 31-37.
- Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R., and Hickey, E. K. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390(6660), 580-586.
- Gajović, O., Todorović, Z., Nešić, L., and Lazić, Z. (2010). Lyme borreliosis: Diagnostic difficulties in interpreting serological results. *Medicinski Pregled*, 63(11-12), 839-843.

- Giambartolomei, G. H., Dennis, V. A., and Philipp, M. T. (1998). *Borrelia burgdorferi* stimulates the production of interleukin-10 in peripheral blood mononuclear cells from uninfected humans and rhesus monkeys. *Infection and Immunity*, 66(6), 2691-2697.
- Glatz, M., Golestani, M., Kerl, H., and Müllegger, R. R. (2006). Clinical relevance of different IgG and IgM serum antibody responses to *Borrelia burgdorferi* after antibiotic therapy for erythema migrans: long-term follow-up study of 113 patients. *Archives of Dermatology*, 142(7), 862-868.
- Glickstein, L., Moore, B., Bledsoe, T., Damle, N., Sikand, V., and Steere, A. C. (2003). Inflammatory cytokine production predominates in early Lyme disease in patients with erythema migrans. *Infection and Immunity*, 71(10), 6051-6053.
- Goettner, G., Schulte-Spechtel, U., Hillermann, R., Liegl, G., Wilske, B., and Fingerle, V. (2005). Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 3602-3609.
- Goodman, J. L., Dennis, D. T., and Sonenshine, D. E. (2005). *Tick-borne diseases of humans*. Washington, D. C.: ASM Press, 401.
- Gray, J., Kahl, O., Lane, R. S., and Stanek, G. (2002). *Lyme borreliosis: biology, epidemiology, and control*: CABI, 347.
- Griffith, J. W., Sokol, C. L., and Luster, A. D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual Review of Immunology*, 32, 659-702.
- Grimm, D., Tilly, K., Byram, R., Stewart, P. E., Krum, J. G., Bueschel, D. M., Schwan, T. G., Policastro, P. F., Elias, A. F., and Rosa, P. A. (2004). Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(9), 3142-3147.
- Grygorczuk, S., Zajkowska, J., Swierzbńska, R., Pancewicz, S., Kondrusik, M., and Hermanowska-Szpakowicz, T. (2005). Concentration of interferon-inducible T cell chemoattractant and monocyte chemotactic protein-1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. *Annales Academiae Medicae Bialostocensis*, 50, 173-178.
- Guner, E. S., Watanabe, M., Hashimoto, N., Kadosaka, T., Kawamura, Y., Ezaki, T., Kawabata, H., Imai, Y., Kaneda, K., and Masuzawa, T. (2004). *Borrelia turcica* sp. nov., isolated from the hard tick *Hyalomma aegyptium* in Turkey. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1649-1652.
- Hallstrom, T., Haupt, K., Kraiczy, P., Hortschansky, P., Wallich, R., Skerka, C., and Zipfel, P. F. (2010). Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(3), 490-498.

- Halperin, J. (2018a). Diagnosis and management of Lyme neuroborreliosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 16(1), 5-11.
- Halperin, J. (2018b). *Lyme Disease: An Evidence-Based Approach*. USA: CABI. 298.
- Halperin, J. (2019a). Lyme neuroborreliosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 32(3), 259-264.
- Halperin, J. (2019b). *A Neurologist's View of Lyme Disease and Other Tick-Borne Infections*. Paper presented at the Seminars in Neurology.
- Halsey, S. J., Allan, B. F., and Miller, J. R. (2018). The role of Ixodes scapularis, Borrelia burgdorferi and wildlife hosts in Lyme disease prevalence: A quantitative review. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(5), 1103-1114.
- Hartiala, P., Hytönen, J., Suhonen, J., Leppäranta, O., Tuominen-Gustafsson, H., and Viljanen, M. K. (2008). Borrelia burgdorferi inhibits human neutrophil functions. *Microbes and Infection*, 10(1), 60-68.
- Hatchette, T., Davis, I., and Johnston, B. (2014). Clinical aspects of Lyme disease: Lyme disease: clinical diagnosis and treatment. *Canada Communicable Disease Report*, 40(11), 194.
- Hauser, U. (2019). Modified interpretation criteria significantly improve performance of commercially available confirmatory assays for the serodiagnosis of Lyme borreliosis: a case-control study with clinically defined serum samples. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(3), 529-539.
- Hefty, P. S., Brooks, C. S., Jett, A. M., White, G. L., Wikel, S. K., Kennedy, R. C., and Akins, D. R. (2002). OspE-related, OspF-related, and Elp lipoproteins are immunogenic in baboons experimentally infected with Borrelia burgdorferi and in human Lyme disease patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 4256-4265.
- Hellerstrom, S. (1951). Erythema chronicum migrans Afzelius with meningitis. *Acta Dermato-Venereologica*, 31(2), 227-234.
- Hellwage, J., Meri, T., Heikkilä, T., Alitalo, A., Panelius, J., Lahdenne, P., Seppälä, I. J., and Meri, S. (2001). The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of Borrelia burgdorferi. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8427-8435.
- Henningsson, A. J., Lager, M., Brännström, R., Tjernberg, I., and Skogman, B. H. (2018). The chemokine CXCL13 in cerebrospinal fluid in children with Lyme neuroborreliosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(10), 1983-1991.
- Hovius, J. W. (2009). Spitting image: tick saliva assists the causative agent of Lyme disease in evading host skin's innate immune response. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(10), 2337-2339.

- Hovius, J. W., van Dam, A. P., and Fikrig, E. (2007). Tick–host–pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends in Parasitology*, 23(9), 434-438.
- Hughes, C. E., and Nibbs, R. J. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS Journal*, 285(16), 2944-2971.
- Internet: Centers for Disease Control and Prevention. (2021). Division of Vector-Borne Disease Retrieved from URL: <https://www.cdc.gov/ncezid/dvbd/index.html> adresinden 12 Mart 2021'de alınmıştır.
- Izac, J. R., Camire, A. C., Earnhart, C. G., Embers, M. E., Funk, R. A., Breitschwerdt, E. B., and Marconi, R. T. (2019). Analysis of the antigenic determinants of the OspC protein of the Lyme disease spirochetes: Evidence that the C10 motif is not immunodominant or required to elicit bactericidal antibody responses. *Vaccine*, 37(17), 2401-2407.
- Jakubzick, C. V., Randolph, G. J., and Henson, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*, 17(6), 349-362.
- Jansky, L., Reymanova, P., and Kopecky, J. (2003). Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS, or infected by *Borrelia*. *Physiological Research*, 52(5), 593-598.
- Johnson, R. C., Schmid, G. P., Hyde, F. W., Steigerwalt, A., and Brenner, D. J. (1984). *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(4), 496-497.
- Jones, K. L., Muellegger, R. R., Means, T. K., Lee, M., Glickstein, L. J., Damle, N., Sikand, V. K., Luster, A. D., and Steere, A. C. (2008). Higher mRNA levels of chemokines and cytokines associated with macrophage activation in erythema migrans skin lesions in patients from the United States than in patients from Austria with Lyme borreliosis. *Clinical Infectious Diseases*, 46(1), 85-92.
- Jovanovic, D., Atanasievska, S., Protic-Djokic, V., Rakic, U., Lukac-Radoncic, E., and Ristanovic, E. (2015). Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in occupationally exposed persons in the Belgrade area, Serbia. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 807-814.
- Kadkhoda, K., and Gretchen, A. (2018). Higher sensitivity of the recomLine *Borrelia* IgG immunoblot kit than of the standard lyme IgG immunoblot kit according to CDC testing criteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(8), e00527-00518.
- Kaiser, R., and Rauer, S. (1999). Advantage of recombinant borrelial proteins for serodiagnosis of neuroborreliosis. *Journal of Medical Microbiology*, 48(1), 5-10.
- Kazimírová, M., and Stibraniova, I. (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 43.
- Kelesidis, T. (2014). The cross-talk between spirochetal lipoproteins and immunity. *Frontiers in Immunology*, 5, 310.

- Kenedy, M. R., Lenhart, T. R., and Akins, D. R. (2012). The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 66(1), 1-19.
- Kline, K., Falker, S., Dahlberg, S., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2009). *Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions*. *Cell Host & Microbe*, 5(6), 580-592.
- Konrad, F. M., Meichssner, N., Bury, A., Ngamsri, K. C., and Reutershan, J. (2017). Inhibition of SDF-1 receptors CXCR4 and CXCR7 attenuates acute pulmonary inflammation via the adenosine A(2B)-receptor on blood cells. *Cell Death & Disease*, 8(5), e2832.
- Koper, O. M., Kaminska, J., Sawicki, K., and Kemonia, H. (2018). CXCL9, CXCL10, CXCL11, and their receptor (CXCR3) in neuroinflammation and neurodegeneration. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27(6), 849-856.
- Kotál, J., Langhansová, H., Lieskovská, J., Andersen, J. F., Francischetti, I. M., Chavakis, T., Kopecký, J., Pedra, J. H., Kotsyfakis, M., and Chmelař, J. (2015). Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics*, 128, 58-68.
- Kraiczy, P., and Stevenson, B. (2013). Complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*: Structure, function and regulation of gene expression. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(1-2), 26-34.
- Kudryashev, M., Cyrklaff, M., Wallich, R., Baumeister, W., and Frischknecht, F. (2010). Distinct in situ structures of the *Borrelia* flagellar motor. *Journal of Structural Biology*, 169(1), 54-61.
- Kuleš, J., Horvatić, A., Guillemin, N., Galan, A., Mrljak, V., and Bhide, M. (2016). New approaches and omics tools for mining of vaccine candidates against vector-borne diseases. *Molecular BioSystems*, 12(9), 2680-2694.
- Kumar, D., Ristow, L. C., Shi, M., Mukherjee, P., Caine, J. A., Lee, W.Y., Kubes, P., Coburn, J., and Chaconas, G. (2015). Intravital imaging of vascular transmigration by the Lyme spirochete: requirement for the integrin binding residues of the *B. burgdorferi* P66 protein. *Plos Pathogens*, 11(12), e1005333.
- Lantos, P. M., Rumbaugh, J., Bockenstedt, L. K., Falck-Ytter, Y. T., Aguero-Rosenfeld, M. E., Auwaerter, P. G., Baldwin, K., Bannuru, R. R., Belani, K. K., and Bowie, W. R. (2021). Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA), American Academy of Neurology (AAN), and American College of Rheumatology (ACR): 2020 Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Lyme Disease. *Arthritis & Rheumatology*, 73(1), 12-20.
- Lau, T. T., and Wang, D.A. (2011). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(2), 189-197.
- Lee, A. J., and Ashkar, A. A. (2018). The dual nature of type I and type II interferons. *Frontiers in Immunology*, 9, 2061.

- Lelovas, P., Dontas, I., Bassiakou, E., and Xanthos, T. (2008). Cardiac implications of Lyme disease, diagnosis and therapeutic approach. *International Journal of Cardiology*, 129(1), 15-21.
- Li, H., Gang, Z., Yuling, H., Luokun, X., Jie, X., Hao, L., Li, W., Chunsong, H., Junyan, L., and Mingshen, J. (2006). Different neurotropic pathogens elicit neurotoxic CCR9-or neurosupportive CXCR3-expressing microglia. *The Journal of Immunology*, 177(6), 3644-3656.
- Li, X., Neelakanta, G., Liu, X., Beck, D. S., Kantor, F. S., Fish, D., Anderson, J. F., and Fikrig, E. (2007). Role of outer surface protein D in the *Borrelia burgdorferi* life cycle. *Infection and Immunity*, 75(9), 4237-4244.
- Liang, F. T., Brown, E. L., Wang, T., Lozzo, R. V., and Fikrig, E. (2004). Protective niche for *Borrelia burgdorferi* to evade humoral immunity. *The American Journal of Pathology*, 165(3), 977-985.
- Lieskovská, J., Páleníková, J., Langhansová, H., Chagas, A. C., Calvo, E., Kotsyfakis, M., and Kopecký, J. (2015). Tick sialostatins L and L2 differentially influence dendritic cell responses to *Borrelia spirochetes*. *Parasites & Vectors*, 8(1), 275.
- Lipsker, D., and Jaulhac, B. (2009). *Lyme borreliosis: biological and clinical aspects* (Vol. 37). Basel: Karger Medical and Scientific Publishers, 1-8.
- Liu, Z. Y., Qin, H., Hou, X. X., Jiang, Y., Zhen, G., Wu, Y. M., and Wan, K. L. (2013). A Study of the Technique of Western Blot for Diagnosis of Lyme Disease caused by *Borrelia afzelii* in China. *Biomedical Environmental Sciences*, 26(3), 190-200.
- Loetscher, P., Pellegrino, A., Gong, J.H., Mattioli, I., Loetscher, M., Bardi, G., Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I. (2001). The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 2986-2991.
- Ma, B., Christen, B., Leung, D., and Vigo-Pelfrey, C. (1992). Serodiagnosis of Lyme borreliosis by western immunoblot: reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(2), 370-376.
- Madison-Antenucci, S., Kramer, L. D., Gebhardt, L. L., and Kauffman, E. (2020). Emerging Tick-Borne Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), e00083-00018.
- Maric, L. S., Lepej, S. Z., Gorenec, L., Grgic, I., Trkulja, V., Rode, O. D., Roglic, S., Grmoja, T., Barisic, N., and Tesovic, G. (2018). Chemokines CXCL10, CXCL11, and CXCL13 in acute disseminated encephalomyelitis, non-polio enterovirus aseptic meningitis, and neuroborreliosis: CXCL10 as initial discriminator in diagnostic algorithm? *Neurological Sciences*, 39(3), 471-479.
- Marques, Schwartz, I., Wormser, G. P., Wang, Y., Hornung, R. L., Demirkale, C. Y., Munson, P. J., Turk, S.P., Williams, C., and Lee, C.C.R. (2018). Transcriptome assessment of erythema migrans skin lesions in patients with early Lyme disease reveals predominant interferon signaling. *The Journal of Infectious Diseases*, 217(1), 158-167.

- Marques, A. R. (2015). Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(2), 295-307.
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., and Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(2), 1-10.
- Maruskova, M., Esteve-Gassent, M. D., Sexton, V. L., and Seshu, J. (2008). Role of the BBA64 locus of *Borrelia burgdorferi* in early stages of infectivity in a murine model of Lyme disease. *Infection and Immunity*, 76(1), 391-402.
- Mason, L. M., Wagemakers, A., van't Veer, C., Oei, A., van der Pot, W. J., Ahmed, K., van der Poll, T., Geijtenbeek, T. B., and Hovius, J. W. (2016). *Borrelia burgdorferi* induces TLR2-mediated migration of activated dendritic cells in an ex vivo human skin model. *Plos One*, 11(10), e0164040.
- McColl, S. R., Mahalingam, S., Staykova, M., Tylaska, L. A., Fisher, K. E., Strick, C. A., Gladue, R. P., Neote, K. S., and Willenborg, D. O. (2004). Expression of rat I-TAC/CXCL11/SCYA11 during central nervous system inflammation: comparison with other CXCR3 ligands. *Laboratory Investigation*, 84(11), 1418-1429.
- Mead, P. S. (2015). Epidemiology of Lyme disease. *Infectious Disease Clinics*, 29(2), 187-210.
- Mead, P. S., Petersen, J., and Hinckley, A. (2019). Updated CDC recommendation for serologic diagnosis of Lyme disease. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 703.
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 140(6), 771-776.
- Metzemaekers, M., Vanheule, V., Janssens, R., Struyf, S., and Proost, P. (2018). Overview of the mechanisms that may contribute to the non-redundant activities of interferon-inducible CXC chemokine receptor 3 ligands. *Frontiers in Immunology*, 8, 1970.
- Michlmayr, D., and McKimmie, C. S. (2014). Role of CXCL10 in central nervous system inflammation. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, 6, 1.
- Middelveen, M. J., Burke, J., Sapi, E., Bandoski, C., Filush, K. R., Wang, Y., Franco, A., Timmaraju, A., Schlenger, H. A., and Mayne, P. J. (2014). Culture and identification of *Borrelia* spirochetes in human vaginal and seminal secretions. *F1000Research*, 3.
- Miller, J. C., von Lackum, K., Babb, K., McAlister, J. D., and Stevenson, B. (2003). Temporal analysis of *Borrelia burgdorferi* Erp protein expression throughout the mammal-tick infectious cycle. *Infection and Immunity*, 71(12), 6943-6952.
- Miraglia, C. M. (2016). A review of the centers for disease control and prevention's guidelines for the clinical laboratory diagnosis of lyme disease. *Journal of Chiropractic Medicine*, 15(4), 272-280.

- Molins, C. R., Ashton, L. V., Wormser, G. P., Hess, A. M., Delorey, M. J., Mahapatra, S., Schriefer, M. E., and Belisle, J. T. (2015). Development of a metabolic biosignature for detection of early Lyme disease. *Clinical Infectious Diseases*, 60(12), 1767-1775.
- Moniuszko, A., Czupryna, P., Pancewicz, S., Rutkowski, K., Zajkowska, O., Świerzbńska, R., Grygorczuk, S., Kondrusik, M., Owłasiuk, P., and Zajkowska, J. (2014). Evaluation of CXCL8, CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 in serum and cerebrospinal fluid of patients with neuroborreliosis. *Immunology Letters*, 157(1-2), 45-50.
- Montgomery, R. R., Lusitani, D., de Boisfleury Chevance, A., and Malawista, S. E. (2002). Human phagocytic cells in the early innate immune response to *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(12), 1773-1779.
- Morrison, T. B., Weis, J. H., and Weis, J. J. (1997). *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) activates and primes human neutrophils. *The Journal of Immunology*, 158(10), 4838-4845.
- Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hébert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J., and Power, C. A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological Reviews*, 52(1), 145-176.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., and Pfaller, M. A. (2015). *Medical Microbiology*: Elsevier Health Sciences. 321-333.
- Müllegger, R. R., Means, T. K., Shin, J. J., Lee, M., Jones, K. L., Glickstein, L. J., Luster, A. D., and Steere, A. C. (2007). Chemokine signatures in the skin disorders of Lyme borreliosis in Europe: predominance of CXCL9 and CXCL10 in erythema migrans and acrodermatitis and CXCL13 in lymphocytoma. *Infection and Immunity*, 75(9), 4621-4628.
- Müller, M., Carter, S., Hofer, M., and Campbell, I. (2010). the chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity—a tale of conflict and conundrum. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36(5), 368-387.
- Nadelman, R. B., Nowakowski, J., Fish, D., Falco, R. C., Freeman, K., McKenna, D., Welch, P., Marcus, R., Aguero-Rosenfeld, M. E., and Dennis, D. T. (2001). Prophylaxis with single-dose doxycycline for the prevention of Lyme disease after an *Ixodes scapularis* tick bite. *New England Journal of Medicine*, 345(2), 79-84.
- Nakano, H., and Gunn, M. D. (2001). Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation. *The Journal of Immunology*, 166(1), 361-369.
- Neelakanta, G., Li, X., Pal, U., Liu, X., Beck, D. S., DePonte, K., Fish, D., Kantor, F. S., and Fikrig, E. (2007). Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes* ticks. *Plos Pathogens*, 3(3).

- Negishi, H., Taniguchi, T., and Yanai, H. (2018). The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(11).
- Nomiyama, H., Osada, N., and Yoshie, O. (2013). Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history. *Genes to Cells*, 18(1), 1-16.
- Norris, S. J., Carter, C. J., Howell, J. K., and Barbour, A. G. (1992). Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infection and Immunity*, 60(11), 4662-4672.
- Nuttall, P., and Labuda, M. (2008). Saliva-assisted transmission of tick-borne pathogens. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 205-219.
- Ogden, N. H., Lindsay, L. R., Morshed, M., Sockett, P. N., and Artsob, H. (2009). The emergence of Lyme disease in Canada. *Cmaj*, 180(12), 1221-1224.
- Öncel, S. (2018). Türkiye’de Lyme Hastalığı. *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4(3), 103-106.
- Palomino, D. C. T., and Marti, L. C. (2015). Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)*, 13(3), 469-473.
- Panelius, J., Meri, T., Seppälä, I., Eholuoto, M., Alitalo, A., and Meri, S. (2008). Outer surface protein E antibody response and its effect on complement factor H binding to OspE in Lyme borreliosis. *Microbes and Infection*, 10(2), 135-142.
- Parlak, M., Bayram, Y., Çıkman, A., Ceylan, N., and Berktaş, M. (2015). Van Bölgesindeki Riskli Gruplarda *Borrelia burgdorferi* Seropozitifliği. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49(3), 439-445.
- Paules, C. I., Marston, H. D., Bloom, M. E., and Fauci, A. S. (2018). Tickborne diseases—confronting a growing threat. *New England Journal of Medicine*, 379(8), 701-703.
- Petkovic, V., Moghini, C., Paoletti, S., Uguccioni, M., and Gerber, B. (2004). I-TAC/CXCL11 is a natural antagonist for CCR5. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(3), 701-708.
- Piesman, J., and Eisen, L. (2008). Prevention of tick-borne diseases. *Annual Review of Entomology*, 53, 323-343.
- Piesman, J., Mather, T. N., Sinsky, R. J., and Spielman, A. (1987). Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(3), 557-558.
- Pietikainen, A., Maksimow, M., Kauko, T., Hurme, S., Salmi, M., and Hytonen, J. (2016). Cerebrospinal fluid cytokines in Lyme neuroborreliosis. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 273.

- Plusa, T. (2017). History of the study, epidemiology of the disease and characterization of *Borrelia burgdorferi* infection. *Polski Merkurusz Lekarski*, 99-103.
- Polat, E., Çalışır, B., Yücel, A., and Tüzer, E. (1998). Türkiye’de *Ixodes ricinus*’ lardan ilk defa ayrılan ve üretilen iki *Borrelia* kökeni. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 22, 166-173.
- Pritt, B. S., Mead, P. S., Johnson, D. K. H., Neitzel, D. F., Respicio-Kingry, L. B., Davis, J. P., Schiffman, E., Sloan, L. M., Schrieffer, M. E., and Replogle, A. J. (2016). Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(5), 556-564.
- Puius, Y. A., and Kalish, R. A. (2008). Lyme arthritis: pathogenesis, clinical presentation, and management. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 289-300.
- Rad, A. Y., and Hekimler, K. (2007). Seroepidemiologic Study On Lyme Borreliosis In Isparta Region In Turkey. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 35(2), 105-109.
- Radolf, J. D., and Samuels, D. S. (2010). *Borrelia: molecular biology, host interaction and pathogenesis*: Horizon Scientific Press, 547.
- Rahman, S., Shering, M., Ogden, N. H., Lindsay, R., and Badawi, A. (2016). Toll-like receptor cascade and gene polymorphism in host–pathogen interaction in Lyme disease. *Journal of Inflammation Research*, 9, 91.
- Ramesh, G., Didier, P. J., England, J. D., Santana-Gould, L., Doyle-Meyers, L. A., Martin, D. S., Jacobs, M. B., and Philipp, M. T. (2015). Inflammation in the pathogenesis of Lyme neuroborreliosis. *The American Journal of Pathology*, 185(5), 1344-1360.
- Ramesh, G., MacLean, A. G., and Philipp, M. T. (2013). Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators of Inflammation*, 2013.
- Rauer, S., Kayser, M., Neubert, U., Rasiah, C., and Vogt, A. (1995). Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay using purified recombinant 83-kilodalton antigen of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* for serodiagnosis of Lyme disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(10), 2596-2600.
- Ray, G., Schulz, T., Daniels, W., Daly, E. R., Andrew, T. A., Brown, C. M., Cummings, P., Nelson, R., Cartter, M. L., and Backenson, P. B. (2013). Three sudden cardiac deaths associated with Lyme carditis—United States, November 2012–July 2013. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 62(49), 993.
- Revel, A. T., Blevins, J. S., Almazán, C., Neil, L., Kocan, K. M., De La Fuente, J., Hagman, K. E., and Norgard, M. V. (2005). bptA (bbe16) is essential for the persistence of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in its natural tick vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(19), 6972-6977.

- Richter, D., Matuschka, F.-R., Spielman, A., and Mahadevan, L. (2013). How ticks get under your skin: insertion mechanics of the feeding apparatus of *Ixodes ricinus* ticks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1773), 20131758.
- Rizzoli, A., Hauffe, H. C., Carpi, G., Vourc'h, G., Neteler, M., and Rosa, R. (2011). Lyme borreliosis in Europe. *Eurosurveillance*, 16(27), 19906.
- Roberts, N. A. (2015). The Immune System. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 88(1), 99.
- Salazar, J. C., Pope, C. D., Sellati, T. J., Feder, H. M., Kiely, T. G., Dardick, K. R., Buckman, R. L., Moore, M. W., Caimano, M. J., and Pope, J. G. (2003). Coevolution of markers of innate and adaptive immunity in skin and peripheral blood of patients with erythema migrans. *The Journal of Immunology*, 171(5), 2660-2670.
- Salter, M. W., and Stevens, B. (2017). Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature Medicine*, 23(9), 1018.
- Schempp, C., Owsianowsk, M., Lange, R., and Gollnick, H. (1993). Comparison of *Borrelia burgdorferi* ultrasonicate and whole *B. burgdorferi* cells as a stimulus for T-cell proliferation and GM-CSF secretion in vitro. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 279(3), 417-425.
- Schoenborn, J. R., and Wilson, C. B. (2007). Regulation of interferon- γ during innate and adaptive immune responses. *Advances in Immunology*, 96, 41-101.
- Schröder, N. W., Eckert, J., Stübs, G., and Schumann, R. R. (2008). Immune responses induced by spirochetal outer membrane lipoproteins and glycolipids. *Immunobiology*, 213(3-4), 329-340.
- Schuijt, T. J., Hovius, J. W., van Burgel, N. D., Ramamoorthi, N., Fikrig, E., and van Dam, A. P. (2008). The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of serum-sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Infection and Immunity*, 76(7), 2888-2894.
- Schutzer, S. E., Body, B. A., Boyle, J., Branson, B. M., Dattwyler, R. J., Fikrig, E., Gerald, N. J., Gomes-Solecki, M., Kintrup, M., and Ledizet, M. (2018). Direct diagnostic tests for Lyme disease. *Clinical Infectious Diseases*, 68(6), 1052-1057.
- Schutzer, S. E., Fraser-Liggett, C. M., Casjens, S. R., Qiu, W.G., Dunn, J. J., Mongodin, E. F., and Luft, B. J. (2011). Whole-genome sequences of thirteen isolates of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Bacteriology*, 193(4), 1018-1020.
- Schwan, T. G., Piesman, J., Golde, W. T., Dolan, M. C., and Rosa, P. A. (1995). Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 2909-2913.
- Seemanapalli, S. V., Xu, Q., McShan, K., and Liang, F. T. (2010). Outer surface protein C is a dissemination-facilitating factor of *Borrelia burgdorferi* during mammalian infection. *Plos One*, 5(12).

- Sertour, N., Cotte, V., Garnier, M., Malandrin, L., Ferquel, E., and Choumet, V. (2018). Infection kinetics and tropism of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in mouse after natural (via ticks) or artificial (needle) infection depends on the bacterial strain. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Shapiro, E. D. (2014). *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease). *Pediatrics in Review*, 35(12), 500.
- Shi, Y., Xu, Q., Seemanapalli, S. V., McShan, K., and Liang, F. T. (2008). Common and unique contributions of decorin-binding proteins A and B to the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*. *Plos One*, 3(10).
- Shin, J. J., Glickstein, L. J., and Steere, A. C. (2007). High levels of inflammatory chemokines and cytokines in joint fluid and synovial tissue throughout the course of antibiotic-refractory Lyme arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 56(4), 1325-1335.
- Shin, J. J., Strle, K., Glickstein, L. J., Luster, A. D., and Steere, A. C. (2010). *Borrelia burgdorferi* stimulation of chemokine secretion by cells of monocyte lineage in patients with Lyme arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 12(5), 168.
- Sindelar, R. D. (2019). Genomics, Other “OMIC” Technologies, Precision Medicine, and Additional Biotechnology-Related Techniques. In *Pharmaceutical Biotechnology* Springer, 191-237.
- Sirmatel, F., Polat, E., and Türkoglu, S. A. (2015). Lyme disease with unknown clinical presentations: a review of seven cases. *Mediterranean Journal of Infection, Microbes and Antimicrobials*, 4.
- Sjöwall, J., Carlsson, A., Vaarala, O., Bergström, S., Ernerudh, J., Forsberg, P., and Ekerfelt, C. (2005). Innate immune responses in Lyme borreliosis: enhanced tumour necrosis factor- α and interleukin-12 in asymptomatic individuals in response to live spirochetes. *Clinical & Experimental Immunology*, 141(1), 89-98.
- Skogman, B. H., Lager, M., Brudin, L., Jenmalm, M. C., Tjernberg, I., and Henningsson, A. J. (2020). Cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid in relation to diagnosis, clinical presentation and recovery in children being evaluated for Lyme neuroborreliosis. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 101390.
- Skotarczak, B. (2015). Why is There Still no Human Vaccine Against Lyme Borreliosis? *Folia Biol (Krakow)*, 63(3), 159-165.
- Soloski, M. J., Crowder, L. A., Lahey, L. J., Wagner, C. A., Robinson, W. H., and Aucott, J. N. (2014). Serum inflammatory mediators as markers of human Lyme disease activity. *Plos One*, 9(4).
- Sousa, C., Biber, K., and Michelucci, A. (2017). Cellular and molecular characterization of microglia: a unique immune cell population. *Frontiers in Immunology*, 8, 198.
- Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J., and Strle, F. (2012). Lyme borreliosis. *The Lancet*, 379(9814), 461-473.

- Steere, A. C., Malawista, S. E., Snyderman, D. R., Shope, R. E., Andiman, W. A., Ross, M. R., and Steele, F. M. (1977). An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 20(1), 7-17.
- Steere, A. C., Strle, F., Wormser, G. P., Hu, L. T., Branda, J. A., Hovius, J. W., Li, X., and Mead, P. S. (2016). Lyme borreliosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16090.
- Strazza, M., and Mor, A. (2017). Consider the chemokines: a review of the interplay between chemokines and T cell subset function. *Discovery Medicine*, 24(130), 31-39.
- Sutton, D., and Spry, C. (2019). One Dose of Doxycycline for the Prevention of Lyme Disease: A Review of Clinical Effectiveness and Guidelines. 1-15.
- Takayama, K., Rothenberg, R., and Barbour, A. (1987). Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*, 55(9), 2311-2313.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.
- Theel, E. S., Aguero-Rosenfeld, M. E., Pritt, B., Adem, P. V., and Wormser, G. P. (2019). Limitations and confusing aspects of diagnostic testing for neurologic Lyme disease in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(1).
- Tilly, K., Rosa, P. A., and Stewart, P. E. (2008). Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 217-234.
- Timmerman, R., Burm, S. M., and Bajramovic, J. J. (2018). An overview of in vitro methods to study microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 242.
- Tokunaga, R., Zhang, W., Naseem, M., Puccini, A., Berger, M. D., Soni, S., McSkane, M., Baba, H., and Lenz, H.J. (2018). CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation—a target for novel cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*, 63, 40-47.
- Tracy, K. E., and Baumgarth, N. (2017). *Borrelia burgdorferi* manipulates innate and adaptive immunity to establish persistence in rodent reservoir hosts. *Frontiers in Immunology*, 8, 116.
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., and Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563-2582.
- Wallich, R., Moter, S., Simon, M., Ebnet, K., Heiberger, A., and Kramer, M. (1990). The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression, and amplification of the gene. *Infection and Immunity*, 58(6), 1711-1719.

- Wang, G., Petzke, M. M., Iyer, R., Wu, H., and Schwartz, I. (2008). Pattern of proinflammatory cytokine induction in RAW264.7 mouse macrophages is identical for virulent and attenuated *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Immunology*, 180(12), 8306-8315.
- Whiting, D., Hsieh, G., Banerji, A., Schnickel, G., Yun, J., Bonavida, B., and Ardehali, A. (2004). Chemokine MIG/CXCL9 stimulates CD4 T lymphocyte proliferation and IFN- γ expression. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 23(2), S47.
- Wilske, B., Fingerle, V., and Schulte-Spechtel, U. (2007). Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 49(1), 13-21.
- Wooten, R. M., Ma, Y., Yoder, R. A., Brown, J. P., Weis, J. H., Zachary, J. F., Kirschning, C. J., and Weis, J. J. (2002). Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Immunology*, 168(1), 348-355.
- Wormser, G. P. (2006). Early Lyme disease. *New England Journal of Medicine*, 354(26), 2794-2801.
- Wormser, G. P., Dattwyler, R. J., Shapiro, E. D., Halperin, J. J., Steere, A. C., Klemperer, M. S., Krause, P. J., Bakken, J. S., Strle, F., and Stanek, G. (2006). The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 43(9), 1089-1134.
- Wormser, G. P., Tang, A. T., Schimmoeller, N. R., Bittker, S., Cooper, D., Visintainer, P., Aguero-Rosenfeld, M. E., Ogrinc, K., Strle, F., and Stanek, G. (2014). Utility of serodiagnostics designed for use in the United States for detection of Lyme borreliosis acquired in Europe and vice versa. *Medical Microbiology and Immunology*, 203(1), 65-71.
- Wright, W. F., Riedel, D. J., Talwani, R., and Gilliam, B. L. (2012). Diagnosis and management of Lyme disease. *American Family Physician*, 85(11), 1086-1093.
- Yang, X. F., Pal, U., Alani, S. M., Fikrig, E., and Norgard, M. V. (2004). Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *Journal of Experimental Medicine*, 199(5), 641-648.
- Yin, X., Wang, Z., Wu, T., Ma, M., Zhang, Z., Chu, Z., Hu, Q., Ding, H., Han, X., and Xu, J. (2019). The combination of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 levels during primary HIV infection predicts HIV disease progression. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 1-14.
- Yung, S. C., and Farber, J. M. (2013). Chemokines. In *Handbook of Biologically Active Peptides* Elsevier, 656-663.
- Zajkowska, J. (2014). Antibody-based techniques for detection of Lyme disease: a challenging issue. *Antibody Technology Journal*, 4(4), 33-33.

- Zhang, J.M., and An, J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27.
- Zhao, Z., McCloud, B., Fleming, R., and Klempner, M. S. (2007). *Borrelia burgdorferi*-induced monocyte chemoattractant protein-1 production in vivo and in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(2), 528-533.
- Zhou, Y.Q., Liu, D.Q., Chen, S.P., Sun, J., Zhou, X.R., Xing, C., Ye, D.W., and Tian, Y.K. (2019). The role of CXCR3 in neurological diseases. *Current Neuropharmacology*, 17(2), 142-150.
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12(2), 121-127.





EK-1. Etik Kurul Onayı

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU ONAYI
BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY CLINICAL RESEARCHES ETHICS COMMITTEE APPROVAL

Sayı : 11

2.5.2019

Konu: Kararlar

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Lyme oligularının Borrelia burgdorferi antijeni ile uyarılmış periferik kan mononükleer hücrelerinde INF-y, IP-10, I-TAC ve MIG aktivitesinin araştırılması
	ARAŞTIRMANIN İNGİLİZCE ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Investigation of IFN-y IP-10, I-TAC and MIG activity in borrelia burgdorferi antigen stimulated peripheral blood bononuclear cells of lyme cases.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATER)	Doç.Dr.Resul KARAKUŞ
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATERS)	Öğr.Gör.Şeyda KARABÖRK, Prof.Dr.Fatma SIRMATEL, Dr.Öğr.Üyesi Şule Aydın TÜRKÖĞLU, Prof.Dr.Ümit BAĞRIACIK
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2019/77	Tarih (Date): 13.03.2019
	Doç.Dr.Resul KARAKUŞ'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık alanı	Kurumu	İmzası
Prof. Dr. İdris TÜREL (Başkan)	Farmakoloji	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. İsa YILDIZ (Başkan Yrd.)	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Mehmet Hamid BOZTAŞ (Üye)	Ruh Sağlığı Hastalıkları	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Erkan KILINÇ (Bildirimlerden sorumlu üye)	Fizyoloji	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Oya KALAYCIOĞLU (Üye)	Biyoistatistik	BAİBÜ İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Hayati ATALA (Üye)	Protetik Diş Tedavisi	BAİBÜ Diş Hekimliği Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Tamer ÇANKAYA (Üye)	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	BAİBÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Makbule TOKUR KESGİN (Üye)	Hemşirelik	BAİBÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Kutlu AYDIN (Üye)	Antrenörlük	BAİBÜ Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu	
Dr.Hatice Selen SÖYLEMEZ (Üye)	Eczacı	Özel Eczane (BOLU)	
Av. Huri Höllye GÜNEŞ COŞKUN (Üye)	Hukukçu	Özel Hukuk Bürosu (BOLU)	
Ramazan KAYNARPINAR (Sivil-Üye)	Esnaf	Serbest Meslek (BOLU)	

EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU
(Tek sayfa olarak hazırlanacaktır)
(Örnektir)

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı Lyme oligularının *Borrelia burgdorferi* antijeni ile uyumlu periferik kan mononükleer hücrelerinde IFN- γ , IP-10, I-TAC ve MIG aktivitesinin araştırılması'dır. Bu araştırmanın amacı, Lyme hastalığının sebebi bir bakteridir olan *Borrelia burgdorferi* antijenlerine tepki olarak hasta ve kontrol grupları arasındaki Periferik kan mononükleer hücre (PBMC) sitokin ve kemokin düzeyleri arasındaki farkın araştırmasıdır. Bu çalışmada size herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır. Sizde bir tıp uzmanı olarak bilginizdir. Bu çalışmada yer almanız öngörülen süre 30 dk olup, çalışmada yer alacak gönüllülerin sayısı 40'dır.

Bu araştırma ile ilgili olarak sizden kan vermeniz ve tarafımızdan hazırlanan anketi cevaplamanız istenecektir.

Bu çalışmada sizin için herhangi bir risk söz konusu değildir, kan alma sırasında tansiyon düşüklüğü olabilir. Kan alma işlemi sırasında Tansiyon düşmesi için gerekli önlemler alınacaktır. Bu çalışmada sizin için beklenen yararlar bu çalışma sayesinde siz ve sizin gibi Lyme tanısıyla takipli hastalara kısa sürede tam konulabilmesi ve tedavi edilebilmesidir. Bu yararlar sizden alınan örnek sayesinde ulaşılacaktır. Belki de tedaviye ıstık tutulacaktır. Gelişecek yeni bir tedavi açısından siz ve sizin gibi hastaların umut kaynağı olacaktır. (beklenen yarar yoksa da hasta bilgilendirilmiştir). (Varia, embriyo, fetus veya anne sütü ile beslenen yeni doğan için tahmin edilebilir riskler veya uygunluklar, gerekirse göbe kalınması yöntemi uyarı ve bu çalışma için kabul edilebilir gebelikten korunma yöntemleri yazılmalıdır)

Bu araştırmanın tedavisinde uygulanabilecek, ancak şimdilik uygulanmayacak olan herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.

Araştırmaya bağlı herhangi bir zarar söz konusu değildir, ortaya çıkan herhangi bir masraflar bulunmamaktadır. (Sağlık Bakanlığı'ndan izin alınması gerekli olmayan araştırmalar için zorunlu değildir). Araştırma sırasında sizi ilgilendirecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istemeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0 374 253 46 56 -3183 ve 3532 no.lu telefondan Dr. Fatma SIRMATEL ve Dr. Şule AYDIN TÜRKÖĞLU'na başvurabilirsiniz.

Bu çalışmada yer almanız nedeniyle size herhangi bir ulaşım gideri ödenmeyecektir. (yapılacak ödeme miktarı yazılmalıdır); ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu araştırma için BAP (kurum/kuruluş) tarafından desteklenmektedir.

Bu çalışmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabileceğiniz, bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Araştırmacı bilginiz dahilinde veya isteğinizi dışında, uygulanan tedavi başarısının gereklerini yerine getirmenize, çalışma programını aksatmanızı veya tedavinin etkinliğini artırmak vb. nedenlerle sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, size ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Sizden ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayımlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz (tedavinin gizli olması durumunda, gönüllüye kendine ait tıbbi bilgilere ancak verilerin analizinden sonra ulaşabileceği bildirilmelidir).

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlamadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Akıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmaya isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanıdı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gönderilmesini, transfer edilmesini ve işlenmesini konusunda araştırmaya yitiriricisine yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün, Adı-Soyadı: Adresi: Tel.-Faks: Tarih ve İmza:	Açıklamaları yapan araştırmacının, Adı-Soyadı: Şeyda KARABÖRK Görevi: Öğretim görevlisi Adresi: BAİBO Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji AD Tel.-Faks: 0 346 928 55 37 Tarih ve İmza:
Velayet veya velayet altında bulunana için veli veya vasisin, Adı-Soyadı: Adresi: Tel.-Faks: Tarih ve İmza:	Olur alması işlemine başından sonuna kadar taahhük eden kuruluş görevlisinin/gözetmene taahhüğü, Adı-Soyadı: Görevi: Adresi: Tel.-Faks: Tarih ve İmza:

* Bu örnek form araştırıcının fikir vermek için formda bulunması gereken gerekli bilgiler verilerek hazırlanmıştır, gerektiğinde etkilerle yapılmalıdır. İstendiğinde Etik Kurulü onaylanmalıdır ya da Tıp Fakültesi web sayfasından kesin olarak ve üzerinde gerekli düzenlemeler yapılmak suretiyle kullanılabilir (Örn. bu paragraf, metindeki notlar ve parantezler çıkarılmalı ve uygun şekilde düzenlenmelidir). Gönüllünün beyan ve imzası, bilgilendirme metninin devamı şeklinde olmalıdır; kesinlikle ayrı sayfalarda olmalıdır.
Gönüllüleme tarihi 28.11.2013

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Soyadı, Adı : KARABÖRK Şeyda

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri

Medeni hali

Telefon

e-mail

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı/Mikrobiyoloji Uzmanlığı	2012
Lisans	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi İngilizce Biyoloji	2009

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2018- devam ediyor	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Öğretim Görevlisi
2012	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Uzman

Yayınlar

A. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler:

Ayaz, E., Gökbulut, C., Coşkun, H., Türker, A., Karabörk, Ş. ve Ceylan, K. (2015). Evaluation of the anthelmintic activity of pumpkin seeds *Cucurbita maxima* in mice naturally infected with *Aspicularis tetraaptera*. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 7(9), 189-193.

Aydın-Türkoğlu, Ş., Yaman, K., Orallar, H., Çamsarı, Ç., Karabörk, Ş. ve Ayaz, E. (2018). Acute toxoplasmosis and antioxidant levels in the liver, kidney and brain of rats. *Annals of Parasitology*, 64(3), 241-247.

- Aydın-Türkoğlu, Ş., Ögün, M. N., Karabörk, Ş., Yıldız, N. ve Yıldız, S. (2018). The Association of Antiphospholipid Antibodies in Patients with Multiple Sclerosis. *Acta Medica Mediterranea*, 34(3), 637-641.
- Aydın-Türkoğlu, Ş., Ogun, M. N., Karabörk, Ş., Yıldız, S. ve Yıldız, N. (2018). Autoantibodies and Vitamin Levels: Is A Player Or Not in Pathophysiology of Multiple Sclerosis Patients?. *Archives of Clinical and Biomedical Research*, 2(04), 156-166.
- Başman, E., Aydın, M., Kabakuş, N., Koçoğlu-Mücahide, E., Karabörk, Ş. ve Kıyan, A. (2014). A Research on Autoimmunity in the Cases with Epilepsy or Febrile Convulsion. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, Doi: 10.21276.
- Behçet, M., Avcioğlu, F., Karabörk, Ş. ve Kurtoğlu, M. G. (2019). Yatan Hastalarda Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Durumlarının İncelenmesi. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(3), 122-126.
- Behçet, M., Avcioğlu, F., Karabörk, Ş. ve Kurtoğlu, M. G. (2019). Antimicrobial Resistance Ratios of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Various Clinical Samples-A Three- Year Evaluation. *Ankem Dergisi*, 33, 43-48.
- Behçet, M., Karabörk, Ş., Avcioğlu, F., Karaibrahim, A. ve Kurtoğlu, M. G. (2019). Evaluation of the resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains to antituberculous drugs. *Experimental Biomedical Research*, 2(4), 143-148.
- Bekdaş, M., Açar, S., Erkoçoğlu, M., Karabörk, Ş. ve Dilek, M. (2018). Can Serum Galectin-3 Be used for Diagnosis of Childhood Urinary Tract Infections?. *SM Journal of Urology*, 4(1), 1039.
- Bekdaş, M., Çalışkan, B., Karabörk, Ş., Acar, S. ve Kabakuş, N. (2020). Do low vitamin D levels facilitate renal parenchymal injury?. *Paediatrica Indonesiana*, 60(4), 205-11.
- Karabörk, Ş. ve Koçoğlu-Mücahide, E. (2014). Performance of rapid test in detection of HBsAg in frozen sera. *Russian Open Medical Journal*, 3(1), 103-103.
- Karabörk, Ş., Ayaz, E., Aydın-Türkoğlu, Ş., Orallar, H., Yaman, K. ve Çakmak, M. (2018). Abant İzzet Baysal Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesine Başvuran Hastalarda 6 Yıllık *Toxoplasma gondii* Seropozitifliğinin Araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* (Yayın No: 4352860).
- Koçoğlu-Mücahide, E., Mengeloğlu, F. Z., Apuhan, T., Karabörk, Ş. ve Yılmaz, B. (2016). The role of human papilloma virus and herpes viruses in the etiology of nasal polyposis. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46, 310-314.
- Koçoğlu-Mücahide, E. ve Karabörk, Ş. (2014). Impact of Storage Time of Fresh Serum Samples on Rapid Test Results of HBsAg. *Viral Hepatit Dergisi*, 20(2), 61-63.
- Koçoğlu-Mücahide, E. ve Karabörk, Ş. (2014). Dondurulmuş Serumlarda Anti-HCV Saptanmasında Hızlı Testin Performansı. *Viral Hepatit Dergisi*, 20(1), 8-10.

- Koçoğlu-Mücahide, E., Taş, T., Mengeloğlu, Z., Karabörk, Ş. ve Bucak, Ö. (2014). Evaluation of 4 methods for the serological diagnosis of Epstein–Barr virus infection using an immunofluorescence assay as the reference method. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 44, 914-919.
- Koçoğlu-Mücahide, E. ve Karabörk, Ş. (2014). Investigation of Metallo-Beta-Lactamase Producing Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, Doi: 10.5222.
- Koçoğlu-Mücahide, E. ve Karabörk, Ş. (2013). Is *Haemophilus influenzae* better satellite for *Enterococcus faecalis*?. *Russian Open Medical Journal*, 2(3), 0302-0302.
- Koçoğlu-Mücahide, E. ve Karabörk, Ş. (2013). Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Tigesiklin Duyarlılığının Belirlenmesi. *International Journal of Basic and Clinical Medicine*, 1(1), 28-31.
- Koçoğlu-Mücahide, E. ve Karabörk, Ş. (2013). HBV DNA Düzeyleri ile HBV Serolojik Göstergeleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması. *Viral Hepatit Dergisi*, 19(2), 54-57.
- Mengeloğlu, F. Z., Koçoğlu-Mücahide, E., Aktaş, G. ve Karabörk, Ş. (2014). Determination of Anti-nuclear Antibody Pattern Distribution and Clinical Relationship. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 30(2), 380-383.
- Orallar, H., Karabörk, Ş., Bozat, B. G. ve Aydın-Türkoğlu, Ş. (2019). Cerebrospinal Fluid (CSF) IL-17A, IL-17F, IL-34 AND CXCL-13 Levels In Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS/MND) Patients. *Medical Sciences*, 14(3), 154-162.
- Ögün, M. N., Karabörk, Ş., Önerli, M., Aydın-Türkoğlu, Ş. ve Yıldız, S. (2019). Cerebrospinal Fluid Levels of Interleukin-17 and Interleukin-34 in Patients with Neuro-Behcet's Syndrome. *Neurophysiology*, 51(2), 83-87.
- Taş, T., Ayaz, E., Koçoğlu-Mücahide, E., Bucak, Ö. ve Karabörk, Ş. (2014). The Distribution of Intestinal Parasites Detected in the Abant İzzet Baysal University Medical Faculty Hospital. *Abant Medical Journal*, 3(2), 124-127.
- Taş, T., Koçoğlu-Mücahide, E., Mengeloğlu, F. Z., Bucak, Ö. ve Karabörk, Ş. (2013). Investigation of in-vitro susceptibility of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical specimens to tigecycline. *Bosnian journal of Basic Medical Sciences* (Yayın No: 4002297).

B. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Basılan Bildiriler:

- Akdeniz, H., Ayaz, E., Karabörk, Ş., Alver, O. ve Coşkun, H. (2017). *Fasciolosis'li olgularda bazı sitokin (IL-4, IL-5, IL-8, IL-12p70, IL-33) düzeylerinin araştırılması*. 20.Ulusal Parazitoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) Eskişehir.
- Avcioğlu, F., Behçet, M., Duman-Taslamacioğlu, T. ve Karabörk, Ş. (2018). *Pasteurella Multocida-Nadir Bir Sepsis Etkeni*. Uluslararası XXXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster) Antalya.

- Aydın-Türkoğlu, Ş., Karabörk, Ş., Orallar, H. ve Yıldız, N. (2018). *Lyme hastalığı Multipl skleroz etyopatogenezinde ne kadar etkili?*. V. Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Sempozyumu (ISMS) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) Ankara.
- Aydın-Türkoğlu, Ş., Orallar, H., Karabörk, Ş. ve Sirmatel, F. (2018). *Nöroborelyozis: Üç sitokin bir kemokin kasırgası: Bir olgu sunumu*. V. Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Sempozyumu (ISMS) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) Ankara.
- Aydın-Türkoğlu, Ş., Ögün, M. N., Karabörk, Ş., Orallar, H. ve Yıldız, S. (2017). *Antibodies against vimentin-An early biomarker of ischemia?*. FEPS 2017 Vienna Congress, 221(S713), 1-290. (Özet Bildiri/Poster) Viyana.
- Behçet, M., Avcıoğlu, F., Karabörk, Ş. ve Kurtoğlu, M. G. (2018). *Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa Suşlarının antimikrobiyal Direnç Oranları-Üç Yıllıkdeğerlendirme*. Uluslararası XXXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster) Antalya.
- Behçet, M., Avcıoğlu, F., Karabörk, Ş. ve Kurtoğlu, M. G. (2018). *Yatan Hastalarda Çeşitli Klinik Örneklerden izole Edilen Acinetobacter baumannii suşlarının Antimikrobiyal Dirençoranlarının Değerlendirilmesi*. Uluslararası XXXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster) Antalya.
- Ergin, M., Erkoçoğlu, M., Bekdaş, M., Dilek, M., Kabakuş, N. ve Karabörk, Ş. (2017). *Role of objective parameters in assessment of asthma control*. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) Helsinki.
- Karabörk, Ş. (2018). *Trueperella Pyogenes'in Etken Olduğu Bir Mastit Olgusu Mastit ve PemfigusBirlikteliği*. V. Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Sempozyumu (ISMS). (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) Ankara.
- Orallar, H., Aydın-Türkoğlu, Ş., Karabörk, Ş. ve Sirmatel, F. (2018). *Unutulan Hastalık Sifiliz Yeniden Gündeme Geliyor*. 7. Türkiye Ekmud Uluslararası Kongresi 2018 (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) Antalya.
- Orallar, H., Karabörk, Ş., Bozat, B. G. ve Aydın-Türkoğlu, Ş. (2018). *Cerebrospinal Fluid (CSF) IL-17A, IL-17F, IL-34 AND CXCL-13 Levels in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS/MND) Patients*. ISS2018 3rd International Science Symposium Scince Festival: New Horizons in Science Pristina/Kosovo- 2018 (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) Kosova.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

