

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BRUSSELLA HASTALARINDA NRF2,
HEMOKSİJENAZ (HO1), NEOPTERİN
SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra ÖZTÜRK

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nihayet BAYRAKTAR

ŞANLIURFA
2022

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BRUSSELLA HASTALARINDA NRF2,
HEMOKSİJENAZ (HO1), NEOPTERİN
SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra ÖZTÜRK

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nihayet BAYRAKTAR

**Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 21286 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ŞANLIURFA
2022**

TEŞEKKÜR

Tüm zorlukları ve zorluklarını hissettirmeyecek kadar güzellikleriyle beraber geçen 2 yıllık bir serçenin sonunda, bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan babam Mehmet ÖZTÜRK, annem Fatma ÖZTÜRK ve kardeŐim Yunus Emre ÖZTÜRK'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, çalıŐmalarımın başından bitimine kadar bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim, tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesinde, çalıŐmamın bitmesi ve baŐarıya ulaŐmasına kadarki sürecin her aŐamasında katkısını esirgemeyen ve her daim yardımlarını grdğim değerli danıŐmanım sayın Doç. Dr. Öğr. Üyesi Nihayet BAYRAKTAR'a,

Tüm akademik personele ve tez savunmamda hazır bulunan tüm katılımcılara,

Bu süreçte yardımı ve desteğini hissettiğim çok sevgili arkadaŐlarım Kudret BADEM'e ve AyŐenur KÜÇÜK'e,

Türkiye Cumhuriyeti'nin kurucusu ve Ulu Önder Mustafa Kemal ATATÜRK'e Sonsuz saygı ve teŐekkürlerimi bir borç bilirim.

Büşra ÖZTÜRK
2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	v
SİMGELER DİZİNİ	vi
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Brusellanın Tanımı	4
2.2. Tarihçe	5
2.3. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	5
2.4. Üreme Özellikleri	5
2.5. Bakteriyel Özellikleri.....	6
2.6. Sınıflandırma	7
2.7. Patogenez	8
2.8. Antijenik Yapı.....	9
2.9. Etiyoloji.....	11
2.10. Epidemiyoloji	12
2.11. Tanı.....	13
2.11.1. Kan Kültürleri.....	13
2.11.2. Serolojik Testler.....	14
2.11.3. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri.....	15
2.12. Tedavi	15
2.13. Klinik Bulgular	18
2.14. Brusellanın İnsana Bulaşı.....	18
2.15. Nükleer Faktör Eritropoietin-2 (NRF2).....	19
2.16. Neopterin.....	21
2.17. Hemoksijenaz (HO1)	22

3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Etik Kurul İzni.....	25
3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	25
3.3. Örneklerin Hazırlanması.....	25
3.4. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	25
3.5. NRF-2 Analizi	26
3.5.1. Reaktif Hazırlama	26
3.5.2. Testin Prensibi	26
3.6. HO1 Analizi	27
3.6.1. Reaktif Hazırlama	27
3.6.2. Testin Prensibi	28
3.7. Neopterin Analizi	29
3.7.1. Reaktif Hazırlama	29
3.7.2. Testin Prensibi	29
3.8. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
7. KAYNAKLAR	53
8. EKLER	68
-Etik Kurul İzni	
-Tez Çalışması Orjinallik Raporu ve Beyan Belgesi	
-İntihal Raporu	
-Ulusal Tez Veri Giriş Formu	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 4.1. Gruplara göre yaş düzeyleri kutu grafiği.....	34
Şekil 4.2. Gruplara göre HO1 düzeyleri kutu grafiği	35
Şekil 4.3. Gruplara göre NRF2 düzeyleri kutu grafiği.....	35
Şekil 4.4. Gruplara göre Neopterin düzeyleri kutu grafiği.....	36
Şekil 4.5. Gruplara göre HO1 düzeyleri ortancaları	38
Şekil 4.6. Gruplara göre HO1 düzeyleri ortancaları çizgi grafiği	38
Şekil 4.7. Gruplara göre NRF2 düzeyleri ortancaları	39
Şekil 4.8. Gruplara göre NRF2 düzeyleri ortancaları çizgi grafiği	39
Şekil 4.9. Gruplara göre Neopterin düzeyleri ortancaları	40
Şekil 4.10. Gruplara göre Neopterin düzeyleri ortancaları çizgi grafiği.....	40
Şekil 4.11. Gruplara göre HO1, NRF2, Neopterin düzeyleri ortancaları karşılaştırma grafiği.....	41
Şekil 4.12. Tüm değişkenlerin ölçüm ortancaları grafiği.....	41
Şekil 4.13. Tüm değişkenlerin ölçümlerinin ortalama Error Bars grafiği	42

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Bazı brucella cinsi mikroorganizmaların sınıflandırılması	8
Tablo 4.1. Demografik ve klinik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri	32
Tablo 4.2. Gruba göre klinik ölçüm değerlerinin karşılaştırılması.....	33
Tablo 4.3. Grup içerisinde klinik ölçümlerin korelasyonu	36



SİMGELER DİZİNİ

WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
DC	Dentritik Hücreler
GNCB	Gram Negatif Koko Basili
PAMP	Patojenle İlişkili Moleküler Modeller
LPS	Lipopolisakkarit
BrLPS	Brusella Lipopolisakkarit
Om	Dış Zar
Omps	Dış Zar Proteini
TF	Tetik Faktör
BFR	Bakteriyoferritin
A	Abortus
M	Melitensis
R-LPS	R Formu Lipopolisakkarit
NAAT	Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri
SD	Streptomisin ve Doksisisiklin
DR	Doksisisiklin ve Rifampin
ST	Streptomisin ve Tetrasiklin
DG	Doksisisiklin ve Gentamisin
RCTM	Kotrimaksazol ve Rifampisin
UPR	Katlanmamış Protein Tepkisi
BCV	Brucella İçeren Veziküller
ER	Endoplazmik Retikulum
RGSF-A	Ginseng Saponin Fraksiyon A
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Proteinkinazlar
LAMP-1	Lizozomla İlişkili Zar Proteini 1
BCP	Fagozom

NRF2	Nükleer Faktör Eritropoietin 2 ile İlişkili Faktör
GSH	Glutasyon
SOD	Süperoksit Dismutaz
Keap1	Kelch Benzeri ECH ile İlişkili Protein 1
BTB	Geniş Kompleks-tromtrack-bric-a-bric
DGR	Çift Glisin Tekrarı
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
HO1	Hemoksijenaz 1
ARE	Antioksidan Yanıt Elementleri
PKC	Proteinkinaz C
PI3K	Fosfoinositid 3-kinaz
NQO-1	Kinondehidrojenaz
NRF1	Nükleer Solunum Faktörü 1
TFB1M	Transkripsiyon Faktör 1, Mitokondriyal
TFB2M	Transkripsiyon Faktör 2, Mitokondriyal
CO	Karbonmonoksit
BV	Biliverdin
Fe	Demir
H2O	Su
mtROS	İşlevsiz Mitokondri
OS	Oksidatif Stres

ÖZET

BRUSELLA HASTALARINDA NRF2, HEMOKSİJENAZ(HO1), NEOPTERİN SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

Büşra ÖZTÜRK

Tıbbi Biyokimya Yüksek Lisans Tezi

Bruselloz, brusella cinsi bakterilerin neden olduğu, insanlara enfekte hayvanlardan direkt temas, inhalasyon veya et, süt ve süt ürünleri gibi hayvansal ürünlerin tüketimi ile bulaşan bir enfeksiyon hastalığıdır. NRF2 oksidatif ve elektrofilik stresin hücresel sensörüdür. Neopterin, hücre aracılı bağışıklık ile ilişkili bir biyokimyasal belirteçtir. Hemoksijenaz (HO1), oksidatif ve inflamatuvar hasarlar sonucu ortaya çıkan hastalıklarda ana protein olarak kabul edilir. Çalışmamızda brusella hastalarının serumlarının NRF2, Hemoksijenaz (HO1), Neopterin seviyelerinin oksidatif stres, anti-inflamatuvar ve anti-oksidan etkileri baz alınarak bu biyobelirteçlerin brusellanın tanı ve takibinde güvenilir birer marker olabirliklerini araştırmayı amaçladık. Çalışmaya Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniğine başvuran brusella hastaları alındı. 1/160 titre grubu, 1/320 titre grubu, 1/640 titre grubu ve kontrol kanları olmak üzere 4 gruptan oluşan ve oluşan bu gruplardan 30 ar birey çalışmaya dahil edildi. Analiz sonucunda, grup ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca, gruplara göre yaş düzeyleri arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunamamışken, titre oranlarına göre bu biyobelirteçlerin anlamlı olarak değiştiği saptanmıştır. NRF2, HO1 ve Neopterin seviyeleri en düşük sağlıklı kontrol grubundaki bireylerde bulunurken en yüksek 1/640 titre grubunda bulunmuştur. Sonuç olarak, brusella hastalarının NRF2, Hemoksijenaz ve Neopterin düzeylerinin yüksek olması klinik takipte göz önünde bulundurulması gereken parametreler olduklarını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Brusella, NRF2, Neopterin, Hemoksijenaz, Anti-inflamatuvar, Titre

ABSTRACT

EXAMINATION OF NRF2, HEMOXYGENASE(HO1), NEOPTERIN LEVELS IN PATIENTS WITH BRUCELLA

Büşra ÖZTÜRK

Medical Biochemistry Master's Thesis

Brucellosis is an infectious disease caused by Brucella bacteria, transmitted to humans by direct contact with infected animals, by inhalation, or by consumption of animal products such as meat, milk and dairy products. NRF2 is the cellular sensor of oxidative and electrophilic stress. Neopterin is a biochemical marker associated with cell-mediated immunity. Hemoxygenase (HO1) is considered to be the main protein in diseases resulting from oxidative and inflammatory damage. In our study, we aimed to investigate whether these biomarkers can be reliable markers in the diagnosis and follow-up of brucellosis, based on the oxidative stress, anti-inflammatory and anti-oxidant effects of NRF2, Hemoxygenase (HO1), Neopterin levels in the sera of brucella patients. Brucella patients who applied to Harran University Faculty of Medicine Infectious Diseases Outpatient Clinic were included in the study. Thirty individuals each from these groups, which consisted of 4 groups as 1/160 titer group, 1/320 titer group, 1/640 titer group and control blood groups, were included in the study. As a result of the analysis, no significant relationship was found between the group and gender. In addition, while there was no statistically significant difference between the age levels of the groups, it was determined that these biomarkers changed significantly according to the titer ratios. While the NRF2, HO1 and Neopterin levels were lowest in the healthy control group, the highest was found in the 1/640 titer group. In conclusion, high NRF2, Hemoxygenase and Neopterin levels in brucella patients show that they are parameters that should be considered in clinical follow-up.

Keywords: Brucella, NRF2, Neopterin, Hemoxygenase, Anti-inflammatory, Titre

1. GİRİŞ

Brusella, Proteobacteria filumuna, Alphaproteobacteria sınıfına, Rhizobiales takımına, Brucellaceae familyasına ait bir bakteri cinsidir (1).

Bruselloz, tüm dünyada hayvanları ve insanları etkileyen, zayıflatıcı zoonotik ve aynı zamanda subakut veya subkronik bir hastalıktır (2,3). Bruselloz genellikle “Akdeniz ateşi” veya “Malta ateşi” olarak adlandırılır (4).

Brusella türleri, insan vücuduna gastrointestinal ve solunum yolları, konjonktiva ve aşınmış cilt dahil olmak üzere çeşitli yollardan nüfuz edebilen veya transfüzyonla ilgili vakalarda veya transplasental bulaşmada olduğu gibi doğrudan kan dolaşımına erişebilen yüksek oranda bulaşıcı organizmalardır (4,5).

Bruselloz hayvanlardan insanlara bulaşır, sıklıkla insandan insana bulaşır. İnsanlar için özellikle tehlikeli olanlar: B. melitensis, B. suis ve B. abortus, B. canis . İnsanlarda bruselloz, influenza gibi semptomlarla kendini gösterir: dalgalı ateş, artrit, orsit, depresyon, kilo kaybı, hepatomegali ve splenomegali gibi semptomlar görülür ve enfekte hayvanların kan veya dokularıyla doğrudan temas veya kontamine süt ürünlerinin tüketimi neden olur (6,7).

Hastalığa hem erkeklerde hem de kadınlarda ve her yaş grubunda rastlanabilir, en sık görülen 15-35 yaş aralığıdır, cinsiyetler arasında dikkate değer fark görülmez. Riskli gruplar incelendiğinde; hayvancılıkla geçimini sağlayan kişiler, mezbaha işçileri, veteriner hekimler ve veteriner araştırma laboratuvarı çalışanları önceliklidir (8).

Bruselloz, Orta ve Güney Amerika, Orta Doğu, Afrika ve Asya'da yaygın görülen bir hastalıktır ve yılda 500.000'den fazla vakanın küresel insidansına sahiptir. Bazı ülkelerde mesleki tehlike olarak tanımlanmıştır (4,9).

Nükleer faktör (eritroitten türetilen 2) benzeri 2 (NRF2), ilk olarak 1994 yılında Moi ve diğerleri tarafından tanımlanan bir transkripsiyon faktörüdür. NRF2 proteinlerin ve enzimlerin oksidatif strese ve iltihaplanmaya karşı modülasyonu, antioksidan yanıt elemanlarının (ARE) transkripsiyonunu aktive eden ana eylem olarak bilinir. NRF2, inflamasyona veya oksidatif strese (OS) maruz kaldığında, fosforile olur ve çekirdeğe yer değiştirir, proteinlerin ve antioksidan enzimlerin transkripsiyonuna yol açar (10).

Heme oksijenaz (HO) hem metabolizmasında hız kısıtlayıcı enzim olmakla beraber HO1, HO2 ve HO3 olmak üzere üç izoformu mevcuttur. Hsp32 olarak da

bilinen HO1, plasental trofoblastlardan sentezlenmekte olup, ekspresyonu ağır metaller, oksidatif stres, UV radyasyon ve lipopolisakkarit tarafından uyarılan bir stres proteinidir (11).

HO1'in hem konsantrasyonunu azaltıcı etkisi lipidperoksidasyonunu azaltmakta ayrıca artan CO de NO benzeri etkisi ve prositokin oluşumunu engelleyerek apoptozu azaltmaktadır. Oksidatif stresi arttıran hipoksi, hipertermi ve radyasyon gibi faktörlerin HO1'i aktive ettiği bilinmektedir. Bu nedenle HO1 aynı zamanda oksidatif stresin önemli indikatörlerinden birisi olarak gösterilmektedir (12).

Neopterin, çok çeşitli koşullarda ve streslerde inflamasyon sırasında immün aktivasyonun klinik bir belirteci olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, tek başına neopterin analizi, onu interferon-y'ye yanıt olarak oluşturan hücrel reaksiyonları ihmal eder. Neopterin, interferon-y ile aktive olan makrofajlar tarafından üretilen güçlü bir antioksidan olan 7,8-dihidroneopterin oksidasyon ürünüdür. 7,8-dihidroneopterin, oksidana bağlı olarak neopterin veya dihidroksantopterin üreten bir süpürücü reaksiyon yoluyla makrofaj hücrelerini bir dizi oksidandan koruyabilir. Bu nedenle, plazma ve idrar neopterin seviyeleri, 7,8-dihidroneopterin üretmek için makrofaj aktivasyonuna ve ardından neopterin oksidasyonuna bağlıdır (13).

Şu anda, insanlar için etkili bir aşı yoktur, ancak birkaç Brusella aşısı çiftlik hayvanları için erişilebilir durumdadır. Virülans faktörlerinden yoksun canlı, atenüe aşılar hala kalıntı virülans gösterir (örneğin, Live B. abortus aşısı suşu 19, Live B. abortus aşısı suşu RB51, Live B. melitensis aşısı suşu Rev-1). Alt birim aşılardan nispeten güvenli olduğu kanıtlanmıştır ve canlı aşılarla kıyasla daha az endişe uyandırmaktadır. Bağışıklık tepkisini uyarmak için saflaştırılmış proteinler veya DNA sundukları için enfeksiyona neden olmazlar. Araştırmacılar hala hayvancılık aşılardaki iyileştirmeler ve bunların insan enfeksiyonlarını önlemedeki uygulamaları üzerinde çalışıyorlar.

Bruselloza karşı başarılı bir tedavi uygulamak için makrofajlara nüfuz eden ve asidik ortamda aktif olan antibiyotikler şarttır. Bruselloz, nadiren ölüme yol açan ve çeşitli terapötik stratejilere iyi yanıt veren bir hastalıktır. Ancak brusellozda tek antibiyotik tedavisi hastalığın nüksetmesine neden olduğu için yetersizdir (6).

Biz bu çalışmada farklı titrelere çalışılan brusellozlu hastaların serumunda HO1, NRF2, Neopterin düzeylerine bakılarak enzim aktivitesi ve oksidatif stres fonksiyonları da dikkate alınarak, bu markerlerin tanı ve tedavide rol alıp alamayacağını inceledik. Bu

Çalıřmanın brusellanın patofizyolojisinin aydınlatılmasında katkı saęlayacaęı dūřunūlmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Brusellanın Tanımı

Bruselloz, *Brusella* cinsi bakterilerin neden olduğu, insanlara brusellozlu hayvanlardan direkt temas, inhalasyon veya et, süt ve süt ürünleri gibi hayvansal ürünlerin kullanımı ile bulaşan bir enfeksiyon hastalığıdır. Hastalık, Akdeniz ateşi, Malta humması, dalgalı ateş, mal hastalığı, Bang ateşi, peynir hastalığı gibi isimlerle de bilinmektedir (4). İnsan ve hayvanlarda önemli morbidite sebebi olan bruselloz, gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere tüm ülkelerde görülen bir halk sağlığı sorunudur (14).

Bruselloz; *brusella* genusu içerisinde yer alan bakterilerin sebep olduğu, özellikle koyun, keçi, sığır, domuz, manda gibi hayvanlarda hastalığa neden olan, bu hayvanlardan da farklı yollarla insanlara bulaşan, vücudun birçok sistemini etkileyen kronik bir inflamatuvar hastalıktır (15).

Brusella, *Proteobacteria* filumuna, *Alphaproteobacteria* sınıfına, *Rhizobiales* takımına, *Brusellaceae* ailesine ait bir bakteri cinsidir. *Alfaproteobakteriler*, bitkilerle ilişkili patojenlerin her ikisine de ait olduğu için bu sınıfa ait çok çeşitli bir gruptur: *Agrobacterium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp. ve hayvanlarda tehlikeli hastalıklara neden olan patojenler, örneğin *Rickettsia* spp., *Brusella* spp., *Bartonella* spp. ve diğerleri (1).

Brusella, insan iskeletlerinde Hipokrat'tan önce tanımlanan eski bir zoonozdur. En yaygın bakteriyel zoonozdur ve tüm dünya genelinde yaygınlığı devam etmektedir. WHO (dünya sağlık örgütü), zoonotik hastalıkları, omurgalı hayvanlardan insanlara doğal olarak bulaşan bulaşıcı hastalıklar olarak tanımlamaktadır. Bruselloz dünyanın birçok yerinde elzem hayvan ve insan morbiditesine neden olur. Enfeksiyon hücre içidir ve insanda sayısız semptomlara sebebiyet verir. Hastalık genellikle pastörize edilmemiş kontamine süt veya ürünlerinin yutulması veya enfekte hayvanlarla direkt temas yoluyla bulaşır. Aerosol bulaşması, aerosol parçacıklarının solunmasıyla sonuçlanan plasenta gibi enfekte olmuş materyallerle temas edenlerde mesleki bir tehlike olarak karşımıza çıkar (16).

2.2. Tarihçe

Bruselloz antik çağlardan beri bilinmesine rağmen insanlarda klinik bir varlık olarak tanımlanmasına rağmen “Akdeniz Gastrik Remittent Ateşi” olarak 19. yüzyılda JA Marston tarafından 1860'ta tam olarak tanımlanmıştır. David Bruce (1865–1931) organizmayı 1887'de Maltalı bir kişinin yardımıyla bir “mikrokok” olarak tanımlamıştır. 1905'te Maltalı bir doktor olan Zammit, keçilerin hastalığı bulaştırdığını farketti. Bruce Afrika'ya taşındı ve 'Trypanosoma Brucei'yi uyku hastalığının bir nedeni olarak belirledi. Bang, sığırlarda düşük yapma nedeni olarak hücre içi basili (Bang basili) tanımlayan Danimarkalı bir veterinerdi. Çok yıllar boyunca Bruce'un mikrokokusu ile Bang'in basili arasında bir ilişki olduğu farkedilemedi. Diğerleri bruselloz hakkındaki bilgilerin geliştirilmesine katkıda bulunmuştur (16).

2.3. Morfolojik Ve Biyokimyasal Özellikleri

Brusella'lar küçük, 0,5-0,7µm eninde, 0,6-1,5 µm boyunda hareketsiz, sporsuz, kirpiksiz, çok defa ikişer ikişer uç uca konumlanma alışkanlığında olan kok, kokobasil veya kısa çomak şeklinde gram negatif bakterilerdir. Bu durumları ile diplokoklara benzerlik gösterirler. Bazı suşlar dışında kapsülleri yoktur (17,18).

Oksidaz aktiviteleri, üreaz aktiviteleri ve H₂S oluşturma özellikleri ise türlere göre farklılık gösterir. Türler ve bu türlere ait biyovarlar, metabolik özellikler, inhibitörlü besiyerinde üreme ve özel bakteriyofajlarla otolize olma özelliklerine göre isimlendirilir (19).

2.4. Üreme Özellikleri

Brusella grubu mikroorganizmaların üremeleri oldukça yavaştır, zenginleştirilmiş katı besiyerlerindeki üremesi üçüncü günden itibaren ancak fark edilir (20-22). 2-3 günlük koloniler konveks, yuvarlak, düzgün kenarlı ve 0,5-0,7 µm eninde, 0,5-1 µm uzunluğunda kısa çomak, kok ya da koko-basillerdir. İlk izolasyonlarda koloni üremesi ise çoğunlukla üçüncü günden sonra başlar ve en fazla gelişme 5-7 günde tamamlanır (20).

Bunların üremeleri için besiyerlerine niasin, biotin, tiamin, nikotinik asit ve serum eklemek şarttır. Optimal üreme ısısı 37°C olup, 40°C'de de üreyebilirler. Optimal

pH 6,7-7,4'tür (23-25). Bazı türler (B. abortus ile B. Suis'in birçok biyovarı) üreyebilmek için CO₂'ye gereksinim duyarlar (26). Brusella bakterileri kan ve çikolata agar içeren ortamlarda üreyebilmektedirler, ancak replikasyonu in vitro olarak oldukça yavaş olmaktadır. Bundan dolayı klinik şüphe olduğu zaman kültürlerin 21 gün ya da daha uzun süre bekletilmesi gerekmektedir (27).

2.5. Bakteriyel Özellikler

Brusella başlangıçta makrofajlar, dendritik hücreler (DC) ve granülositler gibi profesyonel fagositlerin yanı sıra epitelial, fibroblastik ve trofoblastik hücreler de içinde olmak üzere profesyonel olmayan fagositlerde çoğalabilen fakültatif hücre içi parazitik bir bakteri olarak tanımlanmıştır (28).

Brusella, plazma zarı üzerindeki lipidlerle etkileşime girer, bu da Brusella'nın konakçı hücrelerle temas etmesini teşvik eder ve fagositlere içselleştirilmesine aracılık eder. Lipid sallarını, polibazik membran komplekslerinin oluşumu, zar ötesi sinyalleşme ve zar füzyonu gibi membranla ilgili biyolojik süreçleri destekleyebilen glikosfingolipidler ve kolesterol içerir (18).

Oksidaz aktiviteleri, üreaz aktiviteleri ve H₂S oluşturma özellikleri ise türlere göre farklılık gösterir. Türler ve bu türlere ait biyovaryolar, metabolik özellikler, inhibitör içeren besiyerinde üreme ve spesifik bakteriyofajlarla lize olma özelliklerine göre isimlendirilir (29).

Tüm Brusella türlerinin genomları, benzer boyuta ve genom atlasına sahiptir (30). İki dairesel kromozomdan oluşan türün ortalama genom boyutu yaklaşık 3.29 Mb'dir. Kromozom I yaklaşık 2.11 Mb'dir ve kromozom II yaklaşık 1.18 Mb'dir. I. Kromozomun G+C içeriği %57,2'dir ve II. kromozom %57,3 olarak belirlenmiştir (31). Brusella türlerinde plazmitler, kapsüller, pili veya eksotoksinler için klasik virülans genleri yoktur (26).

Brusella'lar küçük, 0,5-0,7µm eninde, 0,6-1,5 µm boyunda hareketsiz, sporsuz, kirpiksiz, çok defa ikişer ikişer uç uca durma alışkanlığında olan kok, kokobasil veya kısa çomak görünümünde gram negatif bakterilerdir. Bu durumları ile diplokoklara benzerler. Bazı suşlar dışında kapsülleri de yoktur (17,32). Tek formlarda ortaya çıkarlar; nadiren çiftler veya zincirler meydana getirirler (33).

Brusella, spor oluşturmayan ve hareketsiz Gram negatif kokobasillerdir (GNCB). Brusella hücre içi bir patojendir, enfeksiyon sırasında hayatta kalır ve makrofajlarda ürer; bakteriler asidik pH'a, düşük oksijen düzeylerine ve düşük besin seviyelerine uyum sağlar (5).

2.6. Sınıflandırma

Brusella cinsi mikroorganizmalar sınıflandırma basamağında, Proteobacteria şubesinin Alphaproteobacteria sınıfının Rhizobiales takımının bir üyesi olarak bilinir. Rhizobiales takımının diğer üyeleri arasında insanlarda hastalık tablosu oluşturan diğer aileler Bartonella ailesi, Afipia ailesi, Methylobacterium ve Roseomonas ailesi şeklindedir (34,35).

Geçmişten bugüne kadar birçok hayvan türünde 12 farklı Brusella etkeni bildirilmiştir. Bu türlerden *B. abortus* çoğunlukla sığırlarda, *B. melitensis* koyun ve keçilerde, *B. suis* domuzlarda, *B. canis* köpeklerde, *B. ovis* koçlarda, *B. neotomae* çöl farelerinde, *B. ceti* ve *B. pinnipedialis* deniz memelilerinde, *B. microti* tarla faresi, yaban domuzu ve tilkide, *B. papionis* habes maymununda, *B. inoipinata* sp. nov. iki insan olgusunda ve *B. vulpis* tilkide oldukları belirlenmiştir (36).

Tablo 2.1. Bazı brucella cinsi mikroorganizmaların sınıflandırılması (37)

Türler	Doğal ev sahibi	Zoonotik Potansiyel	
B. melitensis	Koyun, keçi ve develer	Evet – Yüksek	
B. abortus	Sığır, geyik ve bizon	Evet – Yüksek	
B. suis	Domuzlar, tavşan, ren geyiği/karibu	Evet – Yüksek	
B. canis	Köpekler (evcil ve vahşi)	Evet – Orta	
B. yumurta	Koyun	Bildirilen enfeksiyon yok	
B. neotom	Çöl fareleri	Bildirilen enfeksiyon yok	
B. ceti	Deniz memelileri	Evet – Düşük	
B. pinnipedialis	Pinnipedler	Evet – Düşük	
B. mikroti	Kızıl tilkiler ve ortak tarla fareleri	Bildirilen enfeksiyon yok	
B. inopinata	Bilinmeyen	Evet – Yüksek	
B. papionis	İnsan olmayan primatlar	Bildirilen enfeksiyon yok	
B. vulpis	Kızıl tilki	Bildirilen enfeksiyon yok	

2.7. Patogenez

Brusella'nın konakçıyı enfekte etmesi dört adımdan oluşur, bunlar konak içinde bağıllık, istila, yerleşme ve yayılmayı içerir (38). Patojen makrofajlarda hayatta kalabilir ve daha sonra çoğalabilir ve fagozom-lizozom kompleksinin füzyonunu kontrol edebilir (39). Sonrasında biriken bakteriler konakçının diğer hücrelerine dolaştırılır (40). Ayrıca Brusella spp. için beş virülans faktörü olduğu bildirilmiştir. Bu virülans faktörleri şunlardır; siklik β -glukan, virB T4SS, patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP'ler), iki bileşenli duyuşal ve düzenleyici sistem dahil olmak üzere enfeksiyon ve hücre içi hayatta kalma için gerekli olan BvrS/BvrR ve Brusella LPS (BrLPS). Ayrıca, Brusella spp.'deki diğer virülans faktörleri dış zar proteinlerinden (Omps) oluşur (41). Ayrıca, bir genomik ada (GI_{FeGSH}) B. canis genomunda tanımlanmış

olan *Brusella*'nın patojenitesi ile ilişkilidir (42). Ancak bu bakteri, genomunun patojenitesi ile ilişkili, onu diğer bakteri türlerinden farklı kılan herhangi bir plazmit içermemektedir (43). Omp16, Omp19, Omp25, Omp31, SurA, Dnak, tetik faktör (TF), ribozomal protein L7L12, bakteriyoferritin (BFR) P39 ve lumazin sentaz BLS gibi *Brusella*'nın çeşitli antijenik bileşenleri karakterize edilmiştir (44,45). Bunun yerine çalışmalar, özel antikor tepkisini uyarması beklenen yüzey antijenleri ve lipopolisakkarit (LPS) üzerinde yoğunlaştırıldı (6,46,47). LPS'nin *Brusella*'daki kendine özgü yapısı, düşük bir endotoksisiteyi indüklerken antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç geliştirir. *Brusella*'nın LPS'si ayrıca virülans faktörünü düzenler ve hücre içi replikasyonla birlikte konakta hayatta kalmasını da düzenler (6,48). LPS, Gram-negatif bakterilerde lipid A, O-antijen ve oligosakarit çekirdeğinden meydana gelir (33).

Brusella'nın patojenitesi, düşük seviyelerde besin ve oksijen, asidik pH ve reaktif oksijen ara maddeleri dahil olmak üzere hücre içi replikatif nişinde karşılaşılan dış etmenler uyum sağlama yeteneğinden kaynaklanmaktadır (49). Pürüzsüz *Brusella*, konakçı immün gözetiminden uzaklaşarak bakteriyel hücre içi sağkalımı destekleyerek konakçı hücre apoptozunu inhibe ederken, kaba *Brusella* mutantları (*Brusella canis* ve *Brusella ovis* iki istisnadır) makrofajda nekrozu indükler (50). Bununla birlikte, makrofaj hücre ölümüne aracılık eden mekanizmalar ve virülans faktörleri bildirilmemiştir. Diğer patojenik bakterilerin tersine, *Brusella*'da eksotoksinler, sitolizinler, kapsüller, antijenik varyasyon, fimbria, plazmitler, lizojenik fajlar, ilaca dirençli formlar, endotoksik lipopolisakkarit (LPS) gibi standart virülans faktörleri tanımlanmamıştır (51).

2.8. Antijenik Yapı

Brusella türlerinin hücre çeperinde, gram negatif bakterilerin çoğunda var olan kapsül, fimbria ve pili oluşumları yoktur. Öte yandan, *Brusella* bakterileri, sitoplazma zarını kaplayan sert peptidoglikan tabakası ve fosfolipid-lipopolisakarit (LPS) ve dış zar proteinlerinden (OMP) oluşan dış zar (OM), tüm bu tabakalar, yüzeyi oluşturur. Antijenik yapı çoğunlukla bu dış zar yapısından oluşur.

Brusella spp. suşlarında birçok ortak antijen varken, smooth, rough gibi koloniler arasında LPS antijeni farklı formdadır ve OMP'ler türler arasında birbirinden farklı

yapılardadır. OMP hücrel bağışıklıkta yer alırken LPS antijenleri humoral bağışıklıkta yer alır (52).

OMP'ler potansiyel immünojenler ve koruyucu antijenler olarak tanınırlar. Moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılan OMP'lerden 88 kDa ve 94 kDa moleküler ağırlığa sahip olanlar grup 1 minör proteinleri, 36-38 kDa moleküler ağırlığa sahip olanlar grup 2 porin proteinleri, 31-34 ve 25-27 kDa moleküler ağırlığa sahip olanlar grup 3 proteinler olarak gruplandırılmışlardır. Grup 2 porin proteinlerini kodlayan genler *Brusella* genomuyla yakından ilişkili olan *omp2a* ve *omp2b*'yi içerirler. Majör OMP genleri spesifik ve farklı markırlara sahiptir ve *Brusella*'ların tür ve biyotip sınıflandırmasında kullanılmaktadırlar (53).

Endotoksinler, enterik basillere benzer biyolojik bir etkiye sahipken, LPS kompleksinde endotoksin aktivitesi tespit edilir. *Brusella* türlerinin ana yüzey antijeni, endotoksin aktivitesine sahip bir lipopolisakkarit (LPS) kompleksidir. Buna karşı antikorları belirleyebilmek için aglütinasyon yöntemleri, floresan antikor veya ELISA gibi serolojik testler kullanılmaktadır (54). *B.melitensis*, *B.abortus* ve *B.suis*, bazen A (*abortus*) ve M (*melitensis*) olarak da tanınırlar, çünkü lipopolisakkarit tabakaları, aglütinasyondan sorumlu ısıya karşı dayanıklı yüzey antijenleri olan A ve M antijenlerini içerir. Bu iki antijen, *B. melitensis*, *B.abortus* ve *B. suis*'te değişken oranlarda bulunur. Sonuçta serolojik yaklaşımlar aralarında ayırım yapmak yetersiz kalmaktadır. *B. abortus* ve *B. suis*'te A antijeni M antijeninden daha yüksek iken, *B. melitensis*'te M antijeni A antijeninden daha yüksek bulunmuştur, *B. abortus* genelde tüm serolojik testlerde tanı amaçlı kullanılmaktadır (55,56). Ayrıca, *Brusella* türlerinde, özellikle *B. abortus*'ta, *Salmonella* türlerinin Vi-antijenlerine benzeyen yüzeyel L zarf antijeni tanımlanmıştır ve bu onların immün serum ile aglütinasyonunu engeller. *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis*, O zincirli pürüzsüz lipopolisakkarit (S-LPS) içerdiklerinden düz (S) suşlardır. Bu zincir, bu üç türde ana yüzey antijeni olarak bilinirken, kaba (R) suşları, kaba lipopolisakkaritlerinde (R-LPS) O zinciri içermez. *B. ovis* ve *B. canis*, ana yüzey antijenleri R-LPS olduğu için R suşlarıdır (54,57). *Brusella* ailesinden gelen antijenlerin, *E. coli* 0:116 ve 0:157, bazı *salmonella* suşları, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholera*, *Yersinia enterocolitica* O:9 ve *Stenotrophomonas maltophilia* gibi bakterilerle çapraz etkileşimde bulunduğu gösterilmiştir. *Brusella* türleri, başlıca *B.*

abortus, Salmonella türlerinin Vi-antijenlerine benzer L-antijenlerine sahiptir ve bu onların immün serumla aglütinasyonunu engeller (56,58).

2.9. Etiyoloji

Brusella gram-negatif, fakültatif intraselüler bir kokobasildir. Bartonellae ve Rickettsiae ile proteobakteriler içerisinde değerlendirilmektedir. İnsanlarda hastalığa neden olan altı çeşit brusella vardır. Bunlar ve bunların kaynakları aşağıdaki gibidir:

B. melitensis: Sıklıkla ratlanan türdür. Koyun, keçi ve deve

B. abortus: Sığır, deve ve bizon

B. suis: Domuz, yabantavşanı, rengineyiği ve yaban kemirgenleri

B. canis: Köpek

B. pinnipediae: Fok

B. ceti: Balina, yunus ve domuzbalığı

B. ovis ve B. neotomae: İnsan için patojenik olup olmadıkları henüz bilinmemektedir.

Brusella enfeksiyonlarında bulaşma, mikroorganizmanın inokulum büyüklüğünün çok düşük (10 bakteri) olması yüzünden basitçe oluşur. Bulaşma yolu hayvandan insana, insandan insana (kan ve eksudadan, cinsel yolla, plasenta aracılığıyla, doğum kanalından geçiş sırasında, anne sütüyle), kontamine olmuş yiyecek ve içeceklerin tüketilmesiyle (süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri), doğrudan temasla (ciltteki kesiklerden ve sıyrıklardan, mukoza veya konjonktivadan), inhalasyon yoluyla (kontamine aerosollerle) gerçekleşebilmektedir. Basil sütte 87 gün; tereyağ, yumuşak peynir ve dondurmada haftalar hatta aylar boyu; yoğurtta bir haftadan az; suda 60 gün canlı bir şekilde kalabilmektedir. Brusellozun kuluçka süresi genelde 7 gün ve 10 ay arasındadır. Bulaşmayı takiben basil bağırsak mukozasını geçer, önce lenfatiklere, sonra kana girer ve bakteremiye sebep olur. Kan yoluyla özellikle retiküloendotelial hücrelerden zengin dokuları işgal eder. Makrofajlarca fagosite edilir. Makrofajın lizozomal enzimlerinden hücre içi ortamını farklılaştırarak kendini korur. Bu değişikliği nasıl oluşturduğu tam olarak bulunamamıştır; ancak bakteri yüzeyindeki pürüzsüz, non-endotoksik lipopolisakkaritlerin enflamatuar sitokin yapımını engellemesi, majör histokompatibilite sınıf II antijenlerinin sunumunu değiştirmesi ve enfekte hücrelerin apoptozunu engellemesi yüzünden bakterinin canlı kaldığı, çoğaldığı ve diğer dokuları

işgale yöneldiği varsayılmaktadır. Mikroorganizmanın bu özelliklerinden dolayı brusella enfeksiyonları tekrar etmeye ve kronikleşmeye eğilimlidir (47).

2.10. Epidemiyoloji

Her yıl yaklaşık 500.000 insan brusellozu vakası rapor edilmekte ve bu hastalık Orta Doğu ve Güneydoğu Asya ülkeleri gibi birçok bölgede önemli bir sağlık problemi haline gelmektedir (59).

Hayvanlarda Brusella enfeksiyonunun fetal gelişim ve üreme organları üzerinde zararlı olduğu bilinir, bu da üreme yetmezliğine, düşüklere ve kısırlığa yol açar (60).

Bruselloz birkaç gelişmiş ülkede çiftlik hayvanlarından başarılı bir şekilde eradike edilmiş olsa da, bu enfeksiyonun vahşi yaşamda kontrolü dünya çapında devamlı bir sorun olmuştur (61).

Çiftlik hayvanları ve yaban hayatı brusellozu arasındaki epidemiyolojik bağlantı artık iyi kurulduğundan bu çok önemlidir (62).

İtalya ve İspanya'da yapılan çeşitli çalışmalar, diğer vahşi yaşam türleri ve çiftlik hayvanları ile yakın teması olan yabani hayvanların, genel yaban hayatı popülasyonuna kıyasla daha yüksek bir anti-Brusella antikor prevalansına sahip olduğunu belirtmiştir (63). Dolayısıyla, hayvandan hayvana bulaşma, Brusella enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde önemli bir roldedir ve bu zoonozun yayılma riskine farklı yaban hayatı türlerinin katkısını belirleme ihtiyacını vurgular.

Dünya çapındaki bu önemli sayıda araştırma ve rapora rağmen, karasal yabani hayatta brusellozun küresel prevalansı konusunda hala kesin bir tahmin yoktur. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Dünya Sağlık Örgütü(WHO) ve Office International des Epizootics (OIE) brusellozu dünyadaki ihmal edilen en elzem zoonotik hastalıklardan biri olarak kabul etmektedir (64). İnsanları en sık enfekte eden tür Brusella melitensis'tir, bunu B.abortus, B.suis, B.canis (65)ve B.İnopinata (66) takit etmektedir. Bakteriyel bulaşma nadiren tanımlandığından ve oldukça az bilindiğinden, hayvanlarda ve insanlarda brusellozun tekrar ortaya çıkması üzerindeki vahşi hayattaki Brusella enfeksiyonlarının küresel etkisini ölçmek güçtür.

Kuzey Avrupa ülkelerinin çoğunluğu, Avustralya, Kanada ve Yeni Zelanda'da bruselloza hayvanlar arasında tamamen son verilmesine rağmen ülkemizde özellikle İç Anadolu'da Ankara ve Konya yörelerinde, Güneydoğu Anadolu'da Diyarbakır ve

Şanlıurfa yörelerinde ve Doğu Anadolu'da hayvanlar arasında sıklıkla rastlanan bir zoonozdur (67).

2.11. Tanı

Bruselloz insanlar tarafından sığır, manda, koyun, keçi ve domuzların evcilleştirilmesinden kısa bir süre sonra ve enfeksiyonun insandan insana bulaşması istisnai bir durum olduğundan genellikle bu hayvanlardan bulaşmıştır. Bruselloz insanlarda sürdürülebilir bir enfeksiyon olmadığından ve hastalık neredeyse her zaman enfekte hayvanlara doğrudan veya dolaylı temas etme veya kontamine ürünlerinin tüketimi yoluyla insanlara bulaştığı için, hayvanlarda enfeksiyonun ortadan kaldırılması insan bulaşmasını engellemek için çok önemlidir. İnsan brusellozu herhangi bir organı ve vücut sistemini etkileyebileceğinden enfeksiyonun meydana gelen semptomları patognomonik değildir ve bu nedenle hastalık diğer tıbbi durumlarla sıklıkla karıştırılabilir. Tam tersi, brusellozun erken ve aşırı teşhisi, istenmeyen ilaç etkilerine ve daha önemli olan diğer ciddi bulaşıcı veya bulaşıcı olmayan hastalıkların gözden kaçırılmasına sebebiyet verebilir. Brusella enfeksiyonlarının antibiyotik tedavisi de oldukça zordur ve diğer enfeksiyon hastalıkları için rutin olarak reçete edilmeyen antimikrobiyal ilaç kombinasyonlarının uzun süreli kullanılmasını zorunluluk haline getirir. Bu nedenle insanlarda brusellozun doğru teşhisi, yalnızca erken ve yeterli hasta yönetimi için önemli olmakla kalmaz, aynı zamanda hasta hayvanlara maruz kalma, kontamine gıdaların (özellikle süt ürünleri) tüketimini, laboratuvar güvenlik uygulamalarının doğru yapılmadığını ortaya çıkarabileceğinden halk sağlığı açısından da ciddi bir öneme sahiptir (68).

İnsan brusellozunun mikrobiyolojik tanısı üç farklı modaliteye dayanır: kültür, serolojik ve nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT'ler).

2.11.1. Kan Kültürleri

Brusella organizmalarının kültür tespiti, cins üyelerinin yavaş büyüyen özellikleri, laboratuvar güvenliği endişeleri ve uzun süreli hastalık ve fokal enfeksiyonlarda duyarlılığın azalması nedeniyle engellense de, bakterinin izolasyonu hastalığın kesin kanıtıdır. Bakterinin kültür geri kazanımı, tür seviyesinde ve genotiplendirmede net olarak tanımlanmasına izin vererek, kaynağı izlemeyi, Brusella

suşları içinde ayırım yapmayı ve belirtildiğinde antibiyotik duyarlılık testi gerçekleştirmeyi mümkün kılar (69).

Kan kültürlerinde brusella tespiti, serolojik test sonuçları negatif olduğunda veya düşük veya sınırdaki antikor titreleri bulunduğunda, hastalığın ilk evrelerinde varlığını doğrulamayı da mümkün hale getirir (70).

Brusella izolasyonunun ek bir faydası, enfeksiyondan klinik olarak şüphelenilmeyen ama organizmanın, spesifik olmayan bir ateşli sendromun düzenli çalışmasının bir parçası olarak alınan bir kan kültüründen geri kazanıldığı hastalarda doğru bir tanı koymasındır. Bu önemli bir olaydır çünkü zoonotik kaynaklara önceden maruz kalma öyküsü, hastalığın uzun süreli kuluçka süresi, yani haftalar veya aylar nedeniyle her zaman ortaya çıkarılamaz. Brusellozun klinik özellikleri genellikle sistemik ve lokalize enfeksiyonlar ve romatizmal veya hematolojik hastalıklar dahil olmak üzere diğer tıbbi durumları düşündürür. Hastalık ihtimali varsayılmadığında Brusella-spesifik serodiagnostik testler ve nükleik asit amplifikasyon testleri istenmez ve bu nedenle tanı gözden kaçabilir (68).

2.11.2. Serolojik Testler

Brusellozun serodiagnozu, genellikle, bir aglütinasyon testinde verilen bir titre, bir cutoff enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) okuma değeri veya bir lateral akış testinde bir bandın görünümü veya yoğunluğu gibi kriterlere dayanır. Bu kriterlerin geçerliliği sürekli sorgulanır ve pozitifliği tanımlamaya yönelik eşik değerler, hastalık süresi, bruselloz öyküsü ve mesleki risk faktörleri (örn. hayvancılık işçileri, çiftçiler, vb.) gibi klinik ve epidemiyolojik faktörlere göre değişiklik gösterir. Zoonozun endemik olduğu bölgelerde asemptomatik ve kendini sınırlayan Brusella enfeksiyonu atakları çoğunlukla görülür ve IgG izotip antikorları, başarılı antibiyotik tedavisinin bitiminden sonra aylarca sürebilir. Bu endemik bölgelerde ve organizmaya tekrar maruz kalan bireylerde bulunan anti-Brusella antikorlarının yüksek seroprevalansını gösterir. Bu nedenle, hastaları belirlemeye yönelik herhangi bir kriterin duyarlılığı ve özgüllüğü, sadece araştırılan laboratuvar değişkeninin içsel özelliklerine değil, aynı zamanda araştırılan popülasyonun özelliklerine ve bruselloz durumunda yerel epidemiyolojik şartlara da bağlıdır. Örneğin, sağlıklı bireylerin negatif kontroller olarak kullanılması, test özgüllüğünü olduğundan fazla tahmin edebilir (68).

Tam tersi, başlangıçta brusella ile enfekte olduğundan şüphelenilen ancak alternatif bir nihai teşhisi olan ve bu nedenle çapraz reaktif antikorlara sahip olabilecek hastaların kaydedilmesi, testin tespit edilen özgüllüğünü önemli ölçüde azaltabilir. Herhangi bir testin tanısallık performansı, sonuçları altın standart yöntemle bulunanlarla karşılaştırılarak değerlendirilmelidir. Bruselloz için serodiagnostik testlerin değerlendirilmesi, hastalığı tanımlayabilmek için diğer tüm laboratuvar testlerinin ölçülmesi gereken tek bir sorgulanamaz test olmaması gerçeğiyle güçleşmektedir. Herhangi bir biyolojik testin klinik bağlam ışığında değerlendirilmesi gerekmesine karşın, insan brusellozunun anlaşılması güç olan teşhisi ile uğraşırken, bu kolay bir iş değildir ve bu sorun her zaman mevcut mikrobiyolojik yöntemlerle çözülemez. İnsanlarda Brusella enfeksiyonlarının belirtileri değişken ve spesifik olmadığından, semptom ve bulgulara dayanan bir klinik tanı ölçütü olarak oldukça yetersizdir (71).

2.11.3. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri

Son 20 yılda bakteriyel enfeksiyonların ve özellikle ekilemeyen ve kültürü zor olan mikroorganizmaların sebebiyet verdiği moleküler tanıya devamlı ilerlemelere tanık olunmuştur. Titiz yapıları nedeniyle Brusellaspp. en başından beri nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT'ler) ile tanı için doğal adaylar olarak kabul edilmiştir. Çok çeşitli serolojik testler mevcut olmasına ve otomatik kan kültürü aletleri izolasyon için gereken zamanı azaltmış olsa da, insan brusellozunun mikrobiyolojik teşhisine yönelik geleneksel yöntemlerin öncesinde açıklandığı gibi hala önemli sınırlamaları mevcuttur. Bu nedenle insan brusellozunun teşhisi için daha hızlı, daha güvenli ve daha verimli yeni araçlar bulmaya çalışmak daha doğru olacaktır (68).

2.12. Tedavi

Şu anda, insanlar için etkili bir aşı bulunamamıştır ama birkaç Brusella aşısı çiftlik hayvanları için bulunmaktadır. Virülans faktörleri yönünden eksik, canlı, atenüe aşılar hala kalıntı virülans gösterir (örneğin Live B. abortus aşısı suşu 19, Live B. melitensis aşısı suşu Rev-1). Alt birim aşılardan bir nebze güvenli olduğu kanıtlanmıştır ve canlı aşılara kıyasla daha az endişe uyandırmaktadır. Bağışıklık tepkisini uyarmak için saflaştırılmış proteinler veya DNA sunukları için enfeksiyona sebep olmazlar.

Araştırmacılar hala hayvancılık aşılarındaki iyileştirmeler ve bunların insan enfeksiyonlarını engellemedeki uygulamaları üzerinde çalışmaktadırlar (72).

Bruselloza karşı etkili bir tedavi uygulamak için makrofajlara nüfuz eden ve asidik ortamda aktif olan antibiyotikler kullanılmalıdır (73). Bruselloz, nadir olarak lme sebebiyet veren ve çeşitli terapötik stratejilere iyi yanıt veren bir hastalıktır (74). Ancak brusellozda tek antibiyotik tedavisi hastalığın tekrarlanmasına neden olduğu için yetersizdir (4).

Benzer biçimde rifampin, oksitetrasiklin veya doksisisiklin gibi tek ajanla tedavi de yüksek oranda relapslara neden olur (%9-25) ve tedavinin sresinin uzatılması tatmin edici etkiler yaratmaz. Trimetoprim-sülfametoksazol veya siprofloksasin ile tedavi, vakaların sırasıyla %30 ve %83'nde nüks ile sonuçlanır (73).

Tedavi, hastalığın tekrarlanmasını, daha ileri komplikasyonları (artrit, spondilit, vb.) engellemeli ve semptomların hızla düzelmesini sağlamalıdır. Brusella'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde iki antibiyotik kombinasyonu kullanımı monoterapiden daha etkili ve önemlidir. 1986'da WHO, altı hafta boyunca rifampisin ile doksisisiklin, streptomisin ile kombine halde tetrasiklin ile değiştirilmesini tavsiye etmektedir. şu anda, florokinolonlar veya rifampisin, doksisisiklin-streptomisin ve doksisisiklin-rifampisin ile birlikte ko-trimoksazol gibi bruselloz tedavisinde diğer antibiyotiklerin veya kemoterapötiklerin kombinasyonları tercih edilmektedir (75).

Brusellozun streptomisin ve doksisisiklin (SD) ile tedavisi sırasında sırasıyla %7,4 ve %4,8 oranında tedavilerin başarısızlığı ve nüks oranları kaydedilmiştir. Doksisisiklin ve rifampin (DR) veya streptomisin ile tetrasiklin (ST) ile tedavi sırasında hemen hemen aynı tedavi sonuçları bulundu; bununla birlikte, nüks oranları SD tedavisinden daha yüksekti. Brusellozun başka ikili tedavileri bilinmektedir, örneğin ortalama başarısızlık oranı %5,2 ve relaps oranı %5,9 olan doksisisiklin ve gentamisin (DG) veya tedavi başarısızlığı ve nüks ile ocuk brusellozunda tercih edilen kotrimoksazol ve rifampisin (RCTM) oranları sırasıyla %0-16,4 ve %3,1-10'dur. Siprofloksasin veya ofloksasin ile doksisisiklin, kotrimoksazol, rifampisin ile tedavi, nks oranı %3,2 ila %26'dır (ortalama 11) (76).

Doksisisiklin, rifampisin ve aminoglikozit ile l ilaç tedavisini kullanan üç klinik araştırma mevcuttu. İki ilaç tedavisine kıyasla l ilaç tedavisinin üstünlüğüne dair net bir sonuç yoktur. Bununla beraber, l ilaç tedavisinin hastalığı tekrarlanmasını

engellemede daha etkili olduğu, ancak kısa süreli tedavide iki ilaçlı tedaviye göre daha az başarılı olduğu görölmektedir (74).

Alavi tarafından yapılan çalışma komplike vakalarda (spondilit veya artritli)iki ilaçlı tedaviye göre daha düşük tedavi başarısızlığı oranları nedeniyle sekiz hafta boyunca üçlü tedavi uygulamasını tavsiye etti. Komplike olmayan kronik veya akut vakalarda ve endokardit, spondilit, artrit olmayan komplike vakalarda doksisisiklin ve aminoglikozid tedavisi önerilir. Komplike olmayan vakalarda streptomisin ve doksisisiklin veya gentamisin de savunulmaktadır (76).

Smith ve meslektaşları (2013) brusellozu tedavi etmek için yeni bir yöntem buldular. BCV'nin (brucella içeren veziküller) ER (endoplazmik retikulum) ile bağlantısı, katlanmamış Protein Tepkisi (UPR) olarak adlandırılan konak stres yanıtı sırasında ER yapısının modifikasyonunda gerekli olan endoplazmik retikulumun yeniden modellenmesini gerektirir. UPR'nin tauroursodeoksikolik asit ilacı yoluyla bozulması, Brusella çoğalmasını engelleyebilir. UPR, brusellozda yeni bir hedef olabilir (77).

Brusellozun tedavisi için ginseng saponin fraksiyon A'nın (RGSF-A) etkisiyle ilgili çalışmalar vardır. Ginseng, Asya'da çeşitli hastalıklara çoğu derde deva olarak bilinen değerli bir bitkidir (78). RAW 264,7 hücrelerinde bakteriyel enfeksiyonun ortadan kalkması için RGSF-A'nın etkisini inceledi. Bu çalışmada, tedavi edilen hücrelerde, tedavi edilmeyen kontrol hücrelerine kıyasla bakteriyel içselleştirme ve yapışma oldukça azalmıştır. RGSF-A, MAPK'lerin (mitojenle aktive olan protein kinazlar) aşağı regülasyonunda yer alır ve bu nedenle F-aktinin polimerizasyonunu sınırlar ve hücrelere bakteri penetrasyonunu önler. RGSF-A ayrıca B. abortus'un hücre içi ticaretini etkiler ve B. abortus'un etkileşimini destekler. LAMP-1(lizozomla ilgili zar proteini-1) ile fagozomlar (BCP'ler) içeren. LAMP-1, lizozomların fagozomlarla füzyonundan sorumlu olan, BCP'lerin lizozomla bağlantısını ve bakterilerin yok edilmesini sağlayan transmembran proteindir (79,80). RGSF-A'nın ginsenosid Rg3-panaxadiol saponin bileşenlerinin brusellozu kontrol eden ana etmen olduğunu tespit etmiştir.

Kuşkusuz, brusellozu engellemede ve hatta bunlarla mücadelede etkili olabilecek biyoaktif bileşenler (flavonlar, antosiyaninler, flavonoidler ve tanenler)

içeren Teucrium polium, Alhagi, Eucalyptus, Scophularia Deserti, sarımsak ve kızamık kökleri gibi başka aydınlatıcı bitkiler de vardır (81).

2.13. Klinik Bulgular

Bruselloz ile ilişkili en sık görülen semptomlar; ateş, artralji, iştahsızlık, miyalji ve terlemedir. En sık görülen komplikasyon ve bölgesel tutulum ise; kas eklem tutulumu, genitoüriner sistem tutulumu ve cilt tutulumudur. Santral sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem tutulumları ise daha az sıklıkla görülmüştür (82).

Brusellozda çoğunlukla hastalığa özgü özel semptom görülmemektedir. Rutin olarak titreme ile yükselen ateş ve fazla terlemeyle birlikte baş ağrısı, halsizlik, kilo kaybı, bel ve yaygın oluşan vücut ağrıları ile devam eden bir enfeksiyon hastalığıdır. Klinik olarak akut, subakut veya kronik olabilir. Akut brusellozda genellikle halsizlik, baş ağrısı, terlemeyle birlikte yüksek ateş görülür. Yoğun terleme, ateş ve zayıflama vakaların %90'nı aşkın kişide görülürken yine bu hastalarda kiloda azalma, miyalji, artralji ve sırt ağrısı görülebilmektedir. Brusellozda en çok görülen semptom ateştir ancak spesifik bir karakter değildir. Öğleden sonra ve akşamları ateş daha yüksekken, sabah saatlerinde ise normal seviyelerde seyreder. Ateş genellikle 37,8-40°C arasında değişir. Hastalarda genellikle yorgunluk, güç kaybı ve halsizlik bulguları ile beraber intermittan veya remittan ateş olur. Ateş, üşüme ve titreme ile 40-41°C'ye kadar yükselebilir. Ateş genellikle gece yarısından sonra bol terleme olur ve biraz düşer. Ateş bazen 7-10 gün şeklinde devam eder ve yükseldiği gibi yavaş yavaş düşerek 37°C'ye kadar inebilir. Üç dört günlük ateşsiz dönemi takiben başlangıçta olduğu gibi ateşin tekrar yükseldiği görülür. Bahsedilen bu ateş şekli, bruselloz için tipik ondülan ateş trasesi olarak tanımlanır ve pratikte ondülan ateşe sık rastlanmamaktadır.

Hastalık, semptomların süresine göre; akut (8 haftadan kısa), subakut (8-52 hafta) ve kronik (52 haftadan uzun) olarak sınıflandırılmıştır (83).

2.14. Brusella'nın İnsana Bulaşı

Brusella insan vücuduna solunum ve gastrointestinal yolları, bütünlüğü bozulmuş olan ciltten gibi çeşitli yollardan nüfus edebilir, transfüzyonla ve transplasental yollarla da doğrudan kan dolaşımına erişebilir (4,84,85). Brusella insanlara enfekte çiğ süt ve peynir hatta krema gibi süt ürünlerinin tüketilmesi, enfekte

hayvandaki salgılara temas edilmesi veya kontamine olmuş aerosollerin solunması ile enfekte olur. Brusella hayvanlardaki meme bezlerindedir ve süt ile insanlara bulaşır. En çok bulaşma riski olanlar çiftçiler, çobanlar, veterinerler, kesimhane işçileri gibi devamlı hayvanla temas halinde olan insanlardır (86). İnsanların hastalığa tutulmasında hayvanlar ilk rezervuardır. Hayvanların vajinal dokuları, plasenta ve fetüsü ağırlıkla bakteri ile kontamine edilir. Erythritol fetal adındaki karbonhidrat bulaşın olduğu dokularda çokça bulunur ve bu madde bakterilerin üremesini sağlar bu nedenle de diğer hayvanlara bulaşma riskini de artırır (87).

2.15. Nükleer Faktör Eritropoietin-2 (NRF2)

Çekirdekte nükleer faktör eritropoietin-2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2) aktive edildiğinde, katalaz, glutatyon (GSH) ve süperoksitdismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimlerin üretimini uyarır ve başlatır. Bahsettiğimiz antioksidan enzimler saniyede bir milyona kadar serbest radikali nötralize eder. Serbest radikallerin nötralize olması, oksidatif stres, inflamatuvar yanıt, nekroz, alkalptoz, ferroptoz, ve satofajiyi azaltmak için etkili bir yaklaşımdır. NRF2, kritik bir redoks duyarlı transkripsiyon faktörüdür. Faz II detoksifiye edici enzimlerin ve antioksidan enzimlerin indüklenen ekspresyonunu düzenleyerek vücudun oksidatif stres durumunu düzeltmek, hücrenin hayatta kalmasını sağlamak ve hücrelerin redoks homeostazını korumak için aktive edilir (88).

NRF2 proteini vücudun farklı dokularında (karaciğer, böbrek, dalak ve kalp gibi) eksprese edilir ve yedi yapısal alan (Neh1–Neh7) mevcuttur. Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein-1 (Keap1) iki karakteristik alana sahiptir, yani geniş kompleks-tramtrack-bric-a-brac'ın (BTB) dimerize alanı ve çift glisin tekrarı (DGR). NRF2 ve Keap1 arasındaki ilişki, DGR ile etkileşime giren ve NRF2 aktivitesini negatif olarak düzenleyen N-terminali Neh2 alanı aracılığıyla gerçekleştirilir. Hücreler reaktif oksijen türleri (ROS) veya elektrofiller tarafından saldırıya uğradığında, NRF2 Keap1'den ayrılır ve hızla çekirdeğe geçirilir. Fosforillenmiş NRF2, Mafproteini ile bir heterodimer oluşturur ve daha sonra hemoksijenaz 1 (HO1) ekspresyonunu aktive eden antioksidan yanıt elementleri (ARE'ler) ile birleşir. Bununla beraber, mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'ler), protein kinaz C (PKC) ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) gibi çeşitli protein kinazlar, NRF2'nin fosforilasyonunu indükleyerek NRF2 transkripsiyonel aktivasyonunun düzenlenmesine katılırlar (89).

NRF2:INRF2 (Keap1) oksidatif stresin ve elektrofilik stresin hücrel sensörleridir. NRF2, detoksifiye edici enzimleri, ilaç taşıyıcılarını, antiapoptotik proteinleri ve proteazomları kodlayan bir gen pilinin ekspresyonunu ve koordineli indüksiyonunun denetimini yapan nükleer bir faktördür. Bazal bir durumda, NRF2, inhibitörü INRF2 tarafından sitoplazmada sürekli olarak bozular. INRF2, NRF2'nin Cul3/Rbx1 E3 ubiquitinligaz aracılı bozunması için bir adaptör görevindedir. Antioksidanlar dahil kimyasallar, α dahil tokoferoller-tokoferol (E vitamini) ve fitokimyasallar ve radyasyon, NRF2:INRF2 etkileşimini antagonize eder ve NRF2'nin stabilizasyonuna ve aktivasyonuna sebebiyet verir. Sinyal olayları, NRF2 aktivasyonunu ve baskıyı tekrar optimal duruma sıkı bir şekilde kontrol eden indüksiyon öncesi, indüksiyon ve indüksiyon sonrası tepkileri barındırır (90).

Klasik bir sitoprotektif transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör eritroid 2- ilişkili faktör 2'nin (NRF2) oksidatif hasara karşı koruyucu etkiler gösterdiği tespit edilmiştir (91).

NRF2, normal koşullar altında sitoplazmada bir heterodimer olarak inhibitörü kelch benzeri ECH-ilişkili protein-1 (Keap1) ile birleştirildi (92).

Bununla beraber, oksidatif stresin düşük olduğu şartlar altında, NRF2, Keap-1'den ayrıldıktan sonra çekirdeğe taşındı ve antioksidan yanıt elemanları ile etkileşimi, çeşitli antioksidan enzimlerin ekspresyonunu indükledi (93).

NRF2, sitozolde bulunan ve KEAP-1, tarafından negatif olarak düzenlenen bir transkripsiyon faktörüdür. KEAP-1/NRF2, oksidatif strese karşı hücrenin korunmasının ana düzenleyicisidir. KEAP-1'in ubiquitinasyonu, çekirdeğe yer değiştiren ve antioksidan genler NAD(P)H kinondehidrojenaz 1 (NQO-1) ve hemeoksijenazı (HO1) kopyalayan NRF2'yi serbest bırakır (94).

NRF2 ayrıca anti-inflamatuar etkileye sahiptir ve fare modellerinde hava yolu hasarına karşı korur ve NRF2 aktivatörleri şu anda nörodejeneratif hastalıkları tedavi etmek için klinik deneylerde (95).

Son zamanlarda yapılan bir dizi araştırma, memeli sistemlerinde mitokondriyal biyogenezi düzenleyen yollara ilişkin içgörülere katkıda bulunmuştur. Kanıtlar, düzenlenmiş koaktivatörlerin fizyolojik sinyalleri belirli transkripsiyon faktörü hedeflerine ilettiği bir modeli desteklemektedir. Bu olaylar, mitokondriyal biyogenez ve solunum fonksiyonu için gerekli olan genlerin aktivasyonu ile sonuçlanır. İki

transkripsiyon faktörü, nükleer solunum faktörü 1 (NRF1) ve NRF2, solunum komplekslerinin alt birimlerini kodlayan nükleer genlerin çoğuna etki eder. Ayrıca mitokondriyal transkripsiyon ve replikasyon faktörlerinin (Tfam ve mitokondriyal RNA işleme RNA'sı), hem biyosentetik enzimlerinin ve solunum fonksiyonu için gerekli diğer proteinlerin ifadesinde yer alırlar. Son dönemlerde, hem insanlardan hem de farelerden alınan TFB1M (transkripsiyon faktör 1-mitokondriyal) ve TFB2M (transkripsiyon faktör 2-mitokondriyal) promotörlerinde konsensüs NRF2 tanıma bölgeleri gözlemlenmiştir bu da NRF'lerin bu genlerin de önemli düzenleyicileri olabileceğini düşündürmektedir (13).

2.16. Neopterin

Neopterin ilk olarak 1967'de insanların idrarlarından izole edildi, enfeksiyon ve hastalığın tanısal bir biyobelirteç olarak kullanıldı. Fiziksel travma, kardiyovasküler hastalık, bakteriyel, kanser, paraziter enfeksiyonlar ve viral enfeksiyonların bir sonucu olarak meydana gelen klinik enflamasyonun düzeyi genellikle plazma ve idrar neopterin konsantrasyonu ölçülerek değerlendirilir (96).

Neopterin, hücre aracılı bağışıklık ile ilişkili bir biyokimyasal belirteçtir. Serum neopterin düzeyi, çeşitli hastalıkların patogeneğinde ve ilerleğinde önemli olan hücresel bağışıklık sisteminin aktivasyon aşamasını tasvir eder (97).

Neopterin ve oksitlenmemiş formu 7,8-dihidroneopterin, inflamasyonun olduğu bölgelerde üretildikleri için nispeten hassas iltihaplanma belirteçleridir. 7,8-Dihidroneopterin, interferon-gama uyarımı ile üretilen monosit/makrofaj sentezli bir antioksidandır. 7,8-Dihidroneopterin, her ikisi de inflamatuvar yanıtın ürünü olan süperoksit ve hipokloriti hızla temizleyerek yüksek düzeyde floresanlı neopterin oluşturur (98,99). Bu faktörler, 7,8-dihidroneopterin ve neopterin kullanılarak inflamasyon ve oksidatif stres ölçümünün ikili dengesine izin verir (100). Neopterin yüksek floresan özellikleri olması dolayısıyla idrarda kolayca belirlenebilir, ancak 7,8-dihidroneopterin neopterin yüksek floresan özelliklerini paylaşmaz ve floresan spektroskopisi ile tespit için asit iyodür tedavisi ile neopterin oksitlenmesi gerekir. Bu neopterin ve 7,8-dihidroneopterin kombinasyonuna “total neopterin” adı verilir (13).

Total neopterin neopterin oranı, monosit/makrofaj aktivasyonu ile oksidatif stres arasındaki çevresel dinamikleri araştırmak için kullanılabilir. Düşük oran,

bağışıklık aktivasyonuna göre çok fazla oksidatif stresin olduğu bir ortamı belirtirken, yüksek bir oran, nispeten daha az oksidatif stres ile yüksek düzeyde bağışıklık hücresi aktivasyonunun olduğu bir ortamı gösterir (101,102).

Neopterin ve 7,8-dihidroneopterin böbrekler tarafından hızlı bir şekilde temizlenir ve idrarda konsantre edilir, bu nedenle idrar neopterin idrar konsantrasyonu için düzeltildiğinde kan analizinden daha doğru ve net bir inflamasyon raporu sağladığı görülmektedir (13). Üriner neopterin, invaziv kan toplama ihtiyacını da yok eden bir inflamasyon belirteci olarak sürekli kullanılmıştır (103).

2.17. Hemoksijenaz

Heme oksijenaz-1 (HO1), oksidatif ve inflamatuvar hasarlar sonucunda meydana gelen hastalıklarda ana protein olarak bilinir. HO1 üzerinde, oksidatif hasara ve diğer hücresel streslere karşı hücre koruyucu etkisi ile ilgili olarak, yıllardan beri çok ciddi araştırmalar yapılmaktadır. HO1, hücre içi pro-oksidan heme seviyelerini düzenleyerek veya karbon monoksit (CO) ve biliverdin (BV) gibi yan ürünlerinin farklı faydalarıyla, çeşitli stresli durumlarla savaşmak için yukarı regüle edilecek önemli bir aday protein haline geldi (104).

Bugüne kadar, memelilerde iki HO izoformu (HO1 ve HO2) bildirilmiştir ve üçüncüsü, yani HO3, Hayashi ve meslektaşları tarafından dört HO izoformu (HO1, HO2, HO3 ve HO4) bitkilerde belirlenmiştir. Çeşitli HO izoformları arasında, HO1, farklı patofizyolojik şartlar sırasında ekspresyon seviyesi indüklendiğinden, yoğun araştırma ilgisi olarak kabul edilir (105).

İnsan HO1'in moleküler ağırlığı 32,8 kDa (kilodalton), aminoasit olarak 288 aminoasitten oluşur, HO1 ideal bir sitoprotektif ajan olarak ortaya çıkmıştır ve ekspresyonu ve aktivite seviyelerindeki modülasyon potansiyel bir terapötik değer sağlayabilir (106).

HO1, biyolojik sistemlerde hipoksi, LPS, oksidatif stres, sitokinler, ağır metaller gibi bir dizi uyarıcıya yanıt olacak şekilde indüklenir. HO1 indüksiyonu, hücreler tarafından farklı stres koşullarını nötralize etmek için kullanılan yaygın olarak bilinen bir strateji olduğundan, bu güçlü enzimin hedeflenen indüksiyonu, uygun olmayan bağışıklık tepkisi ve oksidatif düzensizliğin bir yanıtı olarak ortaya çıkan farklı hastalıklara karşı yararlı bir terapötik strateji olarak düşünülebilir. Özellikle sitotoksik

olmayan HO1 indükleyicilerinin tanımlanması, çeşitli oksidatif ve inflamatuvar yanıtlarla savaşmak için yeni bir yaklaşımı benimseyebilir (106, 107).

Mikrozomal metabolik aktivitelerle ilgili erken yapılan çalışmalar, hem oksijenazını (HO) hem degradasyonunda hız kısıtlayıcı bir adım olarak belirlemiştir. HO aktivitesi, biliverdin-IXa (BV) üretmek için karbon monoksit (CO) olarak salınan a-meten köprüsü karbonunda heme'nin oksidatif bölünmesini katalize ederken, merkezi heme demir şelatı demirli demir (Fe II) olarak serbest bırakır. H₂O reaksiyonunda üretilen BV daha sonra NADPH tarafından indirgenir: biliverdin redüktaz, lipitte çözünen safra pigmenti bilirubin-IXa (BR). Hücresel HO aktivitesi, çeşitli biyokimyasal özelliklere sahip olan ve ayrı genlerden ortaya çıkan iki ana izoform, indüklenebilir bir izozim (HO1) ve yapısal şekilde eksprese edilmiş bir izozim (HO2) tarafından sağlanır (108).

HO1, işlevsiz mitokondrilerden (mtROS) veya inflamatuvar hücrelerin aktive edilmiş olanlarından üretilbildiği gibi, gelişmiş reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ile ilişkili pro-oksidan durumlara karşılık verir. Fizyolojik seviyelerin üstünde ve altında değişen oksijen gerilimi durumları (pO₂), mitokondriyal metabolizmadan ROS üretimini de modüle edebilir. Yüksek oksijen gerilimi (hiperoksi), gelişmiş mitokondriyal ROS (mtROS) üretimi ve/veya süperoksit (O₂⁻) üretimi ile temsil edilen artan NADPH oksidaz enzimatik aktivitesi için substrat yoğunluğunu artırır. H₂O için güçlü bir indükleyici sinyal görevi üstlenir (109). Bununla beraber, düşük pO₂ (hipoksi) ayrıca sitokrom - k oksidaz aktivitesini bozarak elektron taşıma sisteminde artan ROS akışını destekler ve özellikle kemirgenlerde türe özgü bir şekilde seçici olarak HO1'i indükler (110).

1968'de keşfinden ve 1988'de bir stres proteini olarak tanımlanmıştır ve o günden bu yana, HO1'in stres uyaranları tarafından indüklenmesi bağlamında hücrelerde ve dokularda koruma sağlayabildiği mekanizmalar, kısmen anlaşılmıştır. Hem yıkımı, HO1'in primer enzimatik işlevi olduğundan, hemoprotein döngüsündeki ve heme çıkarmadaki aktivitesinin, sitoproteksiyonun altında yatan temel bir mekanizmayı yansıttığı geçerli bir hipotezdir (111,112). Gerçekten de, merkezi bir demir atomuna sahip olan hem, serbest radikal üreten tepkimelerin bir pro-oksidanı ve katalizörü olarak gösterilmiştir (113).

Hem oksijenazlar, sitotoksik serbest hemi katabolize etme ve antioksidanlar üretme becerisinden dolayı uzun süredir sitoprotektif enzimler olarak kabul edilmektedir. Hem oksijenaz 1 (HO1), serbest hem ve diğer birçok pro-oksidan uyaranlarca yüksek oranda indüklenebilir olduğu için koruma amaçlı oksidatif strese karşı en önemli hem oksijenaz izozimidir (114,115).

HO1'in genel bir sitoprotektif mekanizma olarak önemi, HO1 eksikliği olan hücrelerin ve hayvanların yanı sıra oksidatif strese ve ilişkili hastalıklara karşı artan duyarlılık gösteren HO1 eksiklikleri veya bozuklukları olan hastalarda yapılan araştırmalarda öneminden bahsedilmiştir (58,116).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul İzni

Bu çalışma Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 04.01.2021 tarihli, 1nolu oturumda ve 29 sayılı, saat 13.30 kararı ile onayı alındı.

3.2. Çalışma grubunun oluşturulması

Bu çalışmada Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniğinde 2021-2022 yılları arasında başvuran brusella hastaları oluşturmaktaydı. 1/160 titre grubu, 1/320 titre grubu, 1/640 titre grubu ve kontrol kanları olmak üzere 4 gruptan oluşturuldu yaş ortalaması olan 22 kadın ve 8 erkek, ve yaş ortalaması olan 22 kadın ve 8 erkek, kontrol grubu ise yaş ortalaması olan 18 kadın ve 12 erkekten oluşan 30 sağlıklı birey çalışmaya dahil edildi.

3.3. Örneklerin Hazırlanması

Kan örnekleri hasta ve kontrol kanları şeklinde toplandı. Alınan kanlar jelli (biyokimya tüpleri) tüpe aktarıldı. Daha sonra kanlar 4000 rpm'de 10 dakika santifüj edilerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlardan Human Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor 2 Elisa Kıt (NRF-2), Human Heme Oxygenase 1 Elisa Kıt (HO-1) ve Neopterin çalışmak üzere -80 °C'de saklandı.

3.4. Kullanılan Araç ve Gereçler

Çalışmamızda Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya AR-GE Laboratuvarında kullanılan cihazlardan yararlanıp çalışılmıştır.

- 1- Santrifüj (Hettich Universal 30 RF)
- 2- Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Finland)
- 3- Derin dondurucu -80 °C (Thermo)
- 4- Vorteks (Nüve, NM 110 model, Türkiye)
- 5- Otomatik biyokimya analizörü (Aeroset, USA)
- 6- Mikroplate Washer (BIORAD, Fransa)

- 7- Mırcı santfirüj (ISOLAB)
- 8- Etüv (Memmert, Germany)
- 9- 1000, 100, 10 µl'lik pipet makinesi (Brand marka)
- 10- 300 ve 50 µl'lik çoklu pipet makinesi (Brand marka)

3.5. NRF-2 Analizi

Human Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor 2 Elisa Kıt Bioassay Technology Laboratory (BT Lab) markalı kitle çalışılmıştır (Catalog no: E3244Hu).

3.5.1. Reaktif Hazırlama

1. Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmelidir.
2. Standart 80ng / ml standart stok solüsyonu oluşturmak için 120µl standardı (80ng / ml) 120µl standart diluent ile sulandırın. Seyreltme yapmadan önce standardın hafifçe karıştırılarak 15 dakika oturmasına izin verin. Standart stok solüsyonunu (80 ng / ml) 1: 2 standart seyreltici ile 40 ng / ml, 20 ng / ml, 10 ng / ml, 5 ng / ml ve 2,5 ng / ml solüsyonlar üretmek için seri olarak seyrelterek çift standart noktaları hazırlayın. Standart seyreltici, sıfır standart (0 ng / ml) olarak işlev görür. Kalan herhangi bir çözelti -20 ° C'de dondurulmalı ve bir ay içinde kullanılmalıdır.
3. Yıkama Tamponu 500 ml 1x Yıkama Tamponu elde etmek için 20 ml Yıkama Tamponu Konsantresini 25x deiyonize veya damıtılmış suyla seyreltin. Konsantrede kristaller oluşmuşsa kristaller tamamen çözülene kadar yavaşça karıştırın.

3.5.2. Testin Prensibi

1. Tüm reaktifleri, standart solüsyonları ve örnekleri talimatlara göre hazırladık. Kullanmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına getirip, Tahlil, oda sıcaklığında gerçekleştirildi.
2. Test için gerekli sayıda şerit belirlendi, Şeritleri kullanmak için çerçevelere yerleştirip, Kullanılmayan şeritler 2-8 derecede saklandı.
3. Standart kuyucuğa 50 µl Standart eklendi. Not: standart kuyuya antikor eklemeyin çünkü standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerir.

4. Numune kuyucuklarına 40 µl numune ekleyip, ardından numune kuyucuklarına 10 µl anti-NRF2 antikoru ekledik, ardından numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklendi. İyice karıştırdık. Plakayı bir mühürleyici ile örtün 37 derecede 60 dakika inkübe ettik.
5. Sızdırmazlık maddesini çıkarıp ve plakayı 5 kez yıkama tamponu ile yıkaydık. Kuyucuklara her yıkama için 30 saniye ile 1 dakika arasında 0,35 ml yıkama tamponu ile ıslattık. Otomatik yıkama için, Tüm kuyuları aspire ettik ve 5 kez yıkama tamponu ile yıkayıp, kuyuları yıkama tamponu ile doldurduk. Plakayı bir kağıt havlu veya başka bir emici malzeme üzerinde kuruttuk.
6. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A ekleyip ve ardından her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu B eklendi. Yeni bir kapatıcı ile kaplanmış plağı karanlıkta 37 derece de 10 dakika inkübe ettik.
7. Her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklendi, mavi renk hemen sarıya döndü.
8. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropłaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) hemen belirlendi.

3.6. HO1 Analizi

Human Heme Oxygenase 1 Elisa Kıt (HO-1) Bioassay Technology Laboratory (BT Lab) markalı kitle çalışılmıştır (Catalog no: E0932Hu).

3.6.1. Reaktif Hazırlama

1. Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmelidir.
2. Standart 9,6 ng / ml standart stok solüsyonu oluşturmak için 120µl standardı (9,6 ng / ml) 120µl standart diluent ile sulandırın. Seyreltme yapmadan önce standardın hafifçe karıştırılarak 15 dakika oturmasına izin verin. Standart stok solüsyonunu (9,6 ng / ml) 1: 2 standart seyreltici ile 4,8 ng / ml, 2,4 ng / ml, 1,2 ng / ml, 0,6 ng / ml ve 0,3 ng / ml solüsyonlar üretmek için seri olarak seyrelterek çift standart noktaları hazırlayın. Standart seyreltici, sıfır standart (0 ng / ml) olarak işlev görür. Kalan herhangi bir çözelti -20 ° C'de dondurulmalı ve bir ay içinde kullanılmalıdır.

3. Yıkama Tamponu 500 ml 1x Yıkama Tamponu elde etmek için 20 ml Yıkama Tamponu Konsantresini 25x deiyonize veya damıtılmış suyla seyreltin. Konsantrede kristaller oluşmuşsa kristaller tamamen çözülene kadar yavaşça karıştırın.

3.6.2. Testin Prensibi

1. Tüm reaktifleri, standart solüsyonları ve örnekleri talimatlara göre hazırladık. Kullanmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına getirip, Tahlil, oda sıcaklığında gerçekleştirildi.
2. Test için gerekli sayıda şerit belirlendi, Şeritleri kullanmak için çerçevelere yerleştirip, Kullanılmayan şeritler 2-8 derecede saklandı.
3. Standart kuyucuğa 50 µl Standart eklendi. Not: standart kuyuya antikor eklemeyin çünkü standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerir.
4. Numune kuyucuklarına 40 µl numune ekleyip, ardından numune kuyucuklarına 10 µl anti-HO1 antikor ekledik, ardından numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklendi. İyi karıştırdık. Plakayı bir mühürleyici ile örtün 37 derecede 60 dakika inkübe ettik.
5. Sızdırmazlık maddesini çıkarıp ve plakayı 5 kez yıkama tamponu ile yıkadık. Kuyucuklara her yıkama için 30 saniye ile 1 dakika arasında 0,35 ml yıkama tamponu ile ıslattık. Otomatik yıkama için, Tüm kuyuları aspire ettik ve 5 kez yıkama tamponu ile yıkayıp, kuyuları yıkama tamponu ile doldurduk. Plakayı bir kağıt havlu veya başka bir emici malzeme üzerinde kuruttuk.
6. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A ekleyip ve ardından her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu B eklendi. Yeni bir kapatici ile kaplanmış plağı karanlıkta 37 derece de 10 dakika inkübe ettik.
7. Her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklendi, mavi renk hemen sarıya döndü.
8. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikro plaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) hemen belirlendi.

3.7. Neopterin Analizi

Human Neopterin Bioassay Technology Laboratory (BT Lab) markalı kitle çalışıldı (Catalogno: E3155Hu).

Sensitivity:0.061nmol/L

3.7.1. Reaktif Hazırlama

1. Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Standart 8ng / ml standart stok solüsyonu oluşturmak için 120µl standardı (16ng / ml) 120µl standart diluent ile sulandırın. Seyreltme yapmadan önce standardın hafifçe karıştırılarak 15 dakika oturmasına izin verildi. Standart stok solüsyonunu (8ng / ml) 1: 2 standart seyreltici ile 4ng / ml, 2ng / ml, 1ng / ml ve 0.5ng / ml solüsyonlar üretmek için seri olarak seyrelterek çift standart noktaları hazırlandı. Standart seyreltici, sıfır standart (0 ng / ml) olarak işlev gördü. Kalan herhangi bir çözelti -20 ° C'de dondurulmalı ve bir ay içinde kullanıldı.
3. Yıkama Tamponu 500 ml 1x Yıkama Tamponu elde etmek için 20 ml Yıkama Tamponu Konsantresini 25x deiyonize veya damıtılmış suyla seyrelti. Konsantrede kristaller oluşmuşsa kristaller tamamen çözülene kadar yavaşça karıştırıldı.

3.7.2. Testin Prensibi

1. Tüm reaktifleri, standart solüsyonları ve örnekleri talimatlara göre hazırlandı.. Kullanılmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına getirildi, Tahlil oda sıcaklığında gerçekleştirilir.
2. Test için gerekli sayıda şerit belirlendi, Şeritleri kullanmak için çerçevelere yerleştirildi, Kullanılmayan şeritler 2-8 derecede saklandı.
3. Standart kuyucuğa 50 µl Standart ekleyin. Not: standart kuyuya antikor eklenilmedi çünkü standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerir.
4. Numune kuyucuklarına 40 µl numune ekleyin, ardından numune kuyucuklarına 10 µl anti-Neopterin antikotu eklendi, ardından numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklendi. İyi karıştırıldı. Plakayı bir mühürleyici ile örtün 37 derecede 60 dakika inkübe edildi.
5. Sızdırmazlık maddesini çıkarın ve plakayı 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Kuyucuklara her yıkama için 30 saniye ile 1 dakika arasında 0,35 ml yıkama

tamponu ile ıslattıldı. Otomatik yıkama için, Tüm kuyuları aspire ettik ve 5 kez yıkama tamponu ile yıkanıldı, kuyuları yıkama tamponu ile dolduruldu. Plakayı bir kağıt havlu veya başka bir emici malzeme üzerinde kuruttuk.

6. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A ekleyin ve ardından her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu B ekledik. Yeni bir kapatıcı ile kaplanmış plağı karanlıkta 37 derece de 10 dakika inkübe ettik.

7. Her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu ekleyin, mavi renk hemen sarıya döndü.

8. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropłaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) hemen belirledik.

3.8. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 23.0 programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu histogram grafikleri ve Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Tanımlayıcı analizler sunulurken ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen (nonparametrik) değişkenler ikiden fazla grup arasında değerlendirilirken Kruskal Wallis Testi kullanılmıştır. Gruplar arasında anlamlı farklılığın sebebi araştırılırken, Benferroni çoklu karşılaştırma testinden faydalanılmıştır. Kategorik değişkenler sunulurken değişkenlerin frekans ve yüzde değerleri kullanılmıştır ve kategorik değişkenlerin analizi Ki-Kare (Exact) Testi ile gerçekleştirilmiştir. Nicel değişkenler arasındaki ilişkileri değerlendirmek için Spearman Korelasyon testinden faydalanılmıştır. P-değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 23.0 programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu histogram grafikleri ve Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Tanımlayıcı analizler sunulurken ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen (nonparametrik) değişkenler ikiden fazla grup arasında değerlendirilirken Kruskal Wallis Testi kullanılmıştır. Gruplar arasında anlamlı farklılığın sebebi araştırılırken, Benferroni çoklu karşılaştırma testinden faydalanılmıştır. Kategorik değişkenler sunulurken değişkenlerin frekans ve yüzde değerleri kullanılmıştır ve kategorik değişkenlerin analizi Ki-Kare (Exact) Testi ile gerçekleştirilmiştir. Nicel değişkenler arasındaki ilişkileri değerlendirmek için Spearman Korelasyon testinden faydalanılmıştır. P-değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

Tablo 4.1. Demografik ve Klinik Değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri

	Ort.	s.s.	Medyan	Min.	Mak.
Yaş	42,22	±16,08	41,50	20,00	81,00
Cinsiyet, n (%)	Kadın	78 (65,00)			
	Erkek	42 (35,00)			
(HO1) ng/ml	21,10	±14,70	18,89	1,78	57,27
NRF2 (ng/ml)	64,32	±31,13	72,19	,65	110,79
Neopterin (nmol/L)	10,73	±6,43	11,46	,67	22,77
Grup, n (%)	1/160	30 (25,00)			
	1/320	30 (25,00)			
	1/640	30 (25,00)			
	Kontrol	30 (25,00)			

Araştırmaya toplam 120 hasta dahil edilmiştir. Bu hastaların yaş ortalaması 42,22±16,08 yıldır. Katılımcıların %65'i kadındır. Katılımcıların (HO1) ng/ml ölçüm ortalamaları 21,10±14,70, NRF2 (ng/ml) ölçüm ortalamaları 64,32±31,13 ve Neopterin (nmol/L) ölçüm ortalamaları 10,73±6,43 'dir. Bireyler dört grupta (1/160, 1/320, 1/640 ve Kontrol) sınıflandırılmış olup her bir grubun oranı %25'dir (Tablo 4.1.).

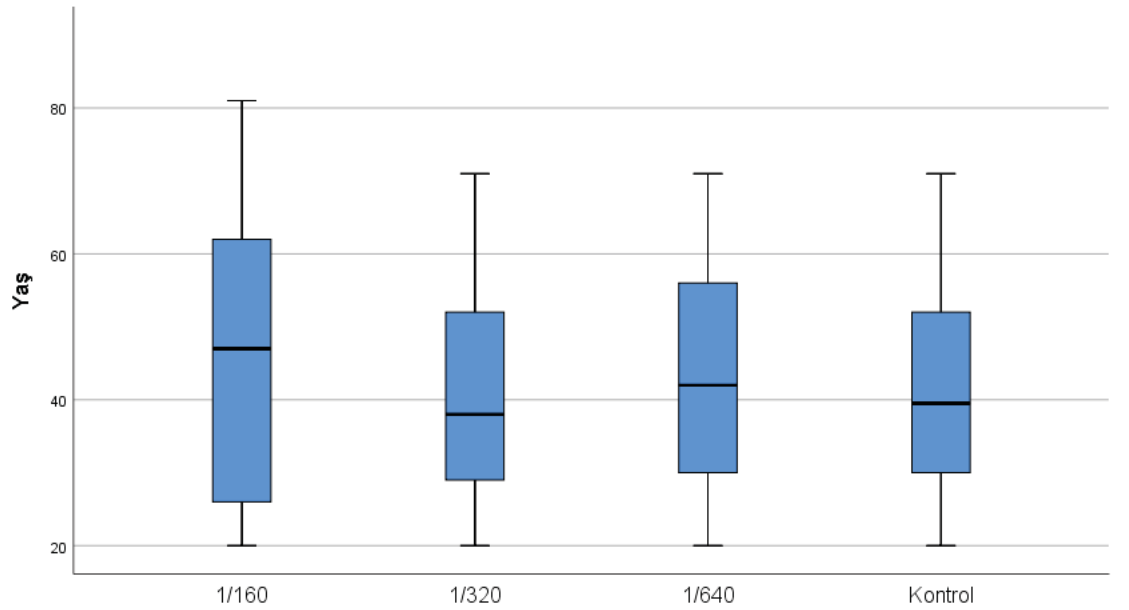
Tablo 4.2. Gruba göre klinik ölçüm değerlerinin karşılaştırılması

	1/160			1/320			1/640			Kontrol			P	
	Ort.	s.d.	Medyan	Ort.	s.d.	Medyan	Ort.	s.d.	Medyan	Ort.	s.d.	Medyan		
Cinsiyet	Kadın	22			(73,33)			22			(73,33)			0,087
	Erkek	8			(26,67)			8			(26,67)			
Yaş	45,20±18,24		47,00	40,17±14,95		38,00	42,80±17,16		42,00	40,70±13,91		39,50	0,706	
(HO1) ng/ml	15,27±2,52		14,31 ^a	23,14±2,81		22,77 ^b	42,01±8,65		41,65 ^c	3,96±1,55		3,55 ^d	<0,001	
NRF2 (ng/ml)	72,74±35,99		90,74 ^a	73,85±5,66		71,86 ^b	87,48±11,27		90,79 ^a	23,20±7,22		23,23 ^c	<0,001	
Neopterin (nmol/L)	9,03±1,65		8,76 ^a	14,66±2,00		14,88 ^b	17,60±2,94		17,95 ^b	1,61±,70		1,66 ^c	<0,001	

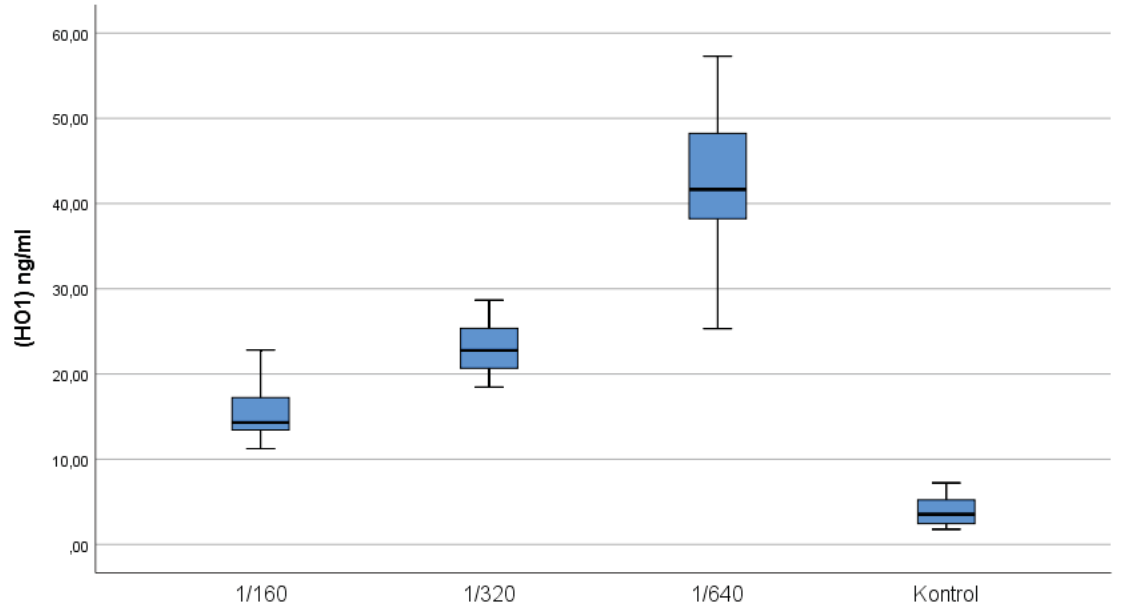
Kruskal Wallis Testi, Ki-Kare Testi, Benferroni Metodu^{a,b,c,d}

Gruplara göre klinik ölçüm düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, grup ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca, gruplara göre yaş düzeyleri arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.1.). Ancak HO1, NRF2 ve Neopterin ölçüm düzeyleri gruplara göre anlamlı olarak değişmektedir ($p<0,05$). HO1 ng/ml ölçüm düzeyi dört grup açısından da anlamlı olarak farklıdır. En düşük HO1 ng/ml ölçümü kontrol grubunda iken en yüksek ölçüm 1/640 grubundadır. İstatistiksel analizler sonucundahemoksijenaz ölçüm düzeyleri gruplara göre anlamlı olarak değişmektedir ($p<0,05$). Hemoksijenaz (ng/ml) ölçümü açısından kontrol grubu (3,96±1,55) diğer gruplardan anlamlı derecede düşüktür, 1/320 (40,17±14,95) grubu ise 1/160 (15,27±2,52) ve 1/640 (42,01±8,65) gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Sırasıyla HO1 düzeyi düşükten yükseğe doğru kontrol grubu, 1/160, 1/320, 1/640 şeklindedir. (Şekil 4.2.). NRF2 (ng/ml) ölçümü açısından kontrol grubu diğer gruplardan anlamlı derecede düşüktür, 1-320 grubu ise 1/160 ve 1/640 gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. İstatistiksel analizler sonucunda NRF2

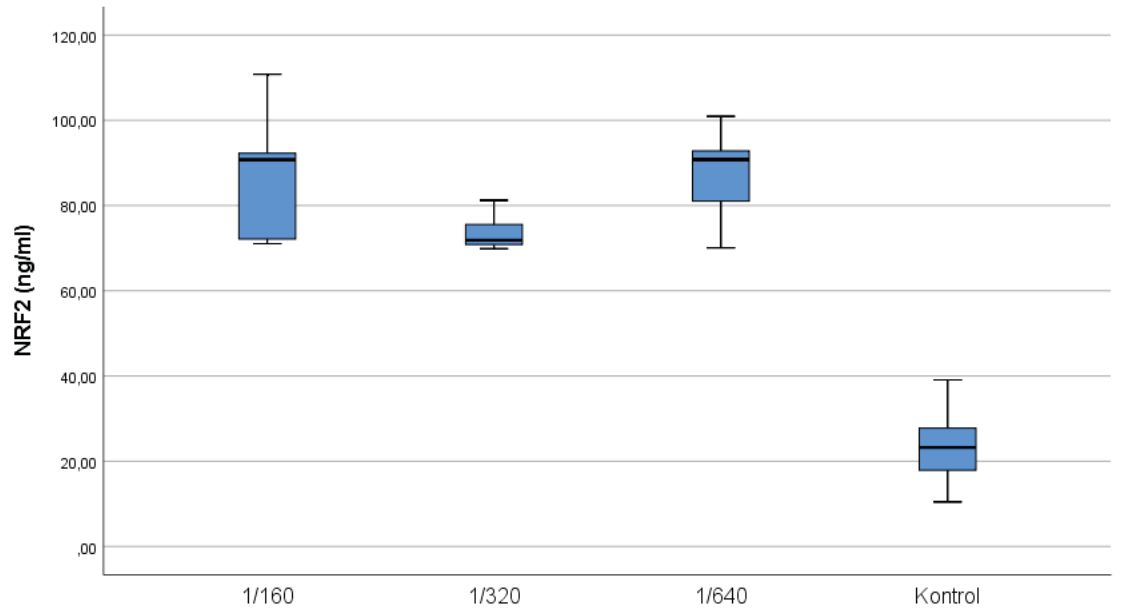
ölçüm düzeyleri gruplara göre anlamlı olarak değişmektedir ($p<0,05$). NRF2 (ng/ml) ölçümü açısından kontrol grubu ($23,20\pm7,22$) diğer gruplardan anlamlı derecede düşüktür, 1/320 ($73,85\pm5,66$) grubu ise 1/160 ($72,74\pm35,99$) ve 1/640 ($87,48\pm11,27$) gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. NRF2 ölçüm düzeyleri düşükten yükseğe doğru sıralanacak olursa kontrol, 1/160, 1/320, 1/640 şeklindedir (Şekil 4.3.). Neopterin (nmol/L) ölçümü açısından kontrol grubunun ölçümü diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur, 1/160 grubunun ölçümü de 1/320 ve 1/640 grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. İstatistiksel analizler sonucunda neopterin ölçüm düzeyleri gruplara göre anlamlı olarak değişmektedir ($p<0,05$). Neopterin (nmol/L) ölçümü açısından kontrol grubu ($1,61\pm0,70$) diğer gruplardan anlamlı derecede düşüktür, 1/320 ($14,66\pm2,00$) grubu ise 1/160 ($9,03\pm1,65$) ve 1/640 ($17,60\pm2,94$) gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Neopterin ölçüm düzeyleri düşükten yükseğe doğru sıralanacak olursa kontrol, 1/160, 1/320, 1/640 şeklinde sıralanır (Şekil 4.4.) (Tablo 4.2.).



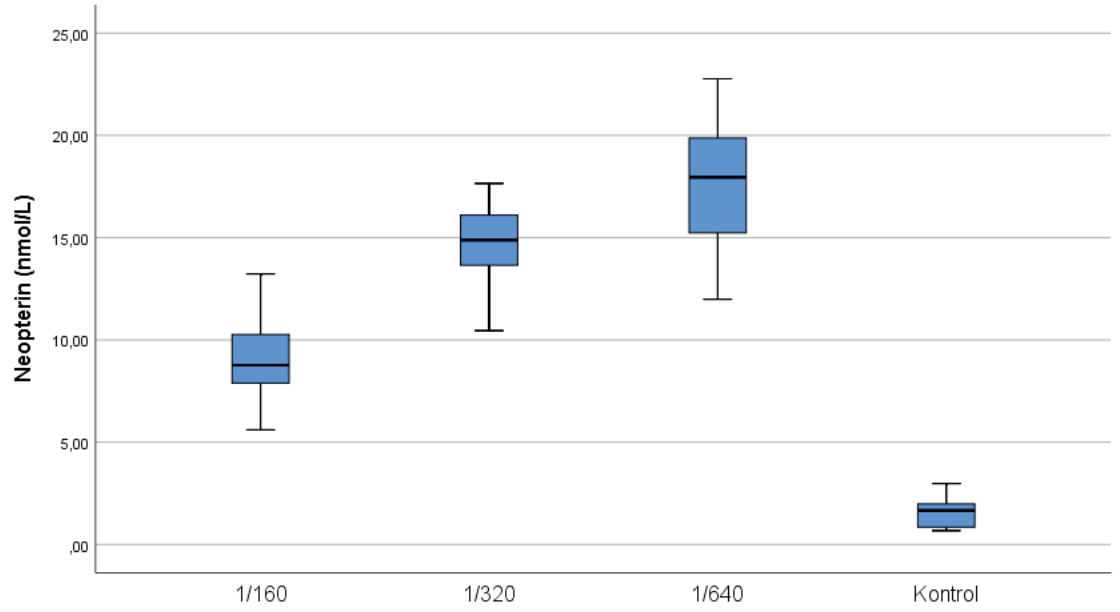
Şekil 4.1. Gruplara göre yaş düzeyleri kutu grafiği



Şekil 4.2. Gruplara göre HO1 düzeyleri kutu grafiği



Şekil 4.3. Gruplara göre NRF2 düzeyleri kutu grafiği



Şekil 2.4. Gruplara göre Neopterin düzeyleri kutu grafiği

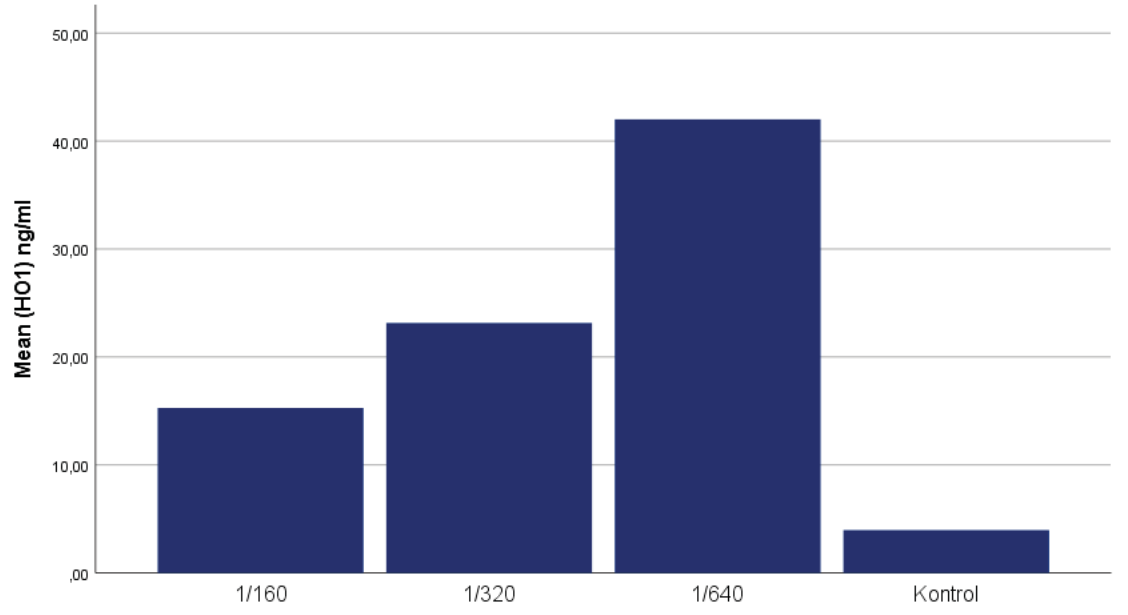
Tablo 4.3. Grup içerisinde klinik ölçümlerin korelasyonu

			Yaş	(HO1) ng/ml	NRF2 (ng/ml)	Neopterin (nmol/L)
1/160	Yaş	r	1,000	0,046	0,135	-0,295
		p	.	0,817	0,494	0,128
	(HO1) ng/ml	r	0,046	1,000	-0,407*	0,092
		p	0,817	.	0,026	0,640
	NRF2 (ng/ml)	r	0,135	-0,311	1,000	-0,031
		p	0,494	0,108	.	0,875
Neopterin (nmol/L)	r	-0,295	0,092	-0,031	1,000	
	p	0,128	0,640	0,875	.	
1/320	Yaş	r	1,000	-0,135	-0,310	-0,178
		p	.	0,476	0,096	0,346
	(HO1) ng/ml	r	-0,135	1,000	0,092	-0,027
		p	0,476	.	0,628	0,888
	NRF2 (ng/ml)	r	-0,310	0,092	1,000	0,192

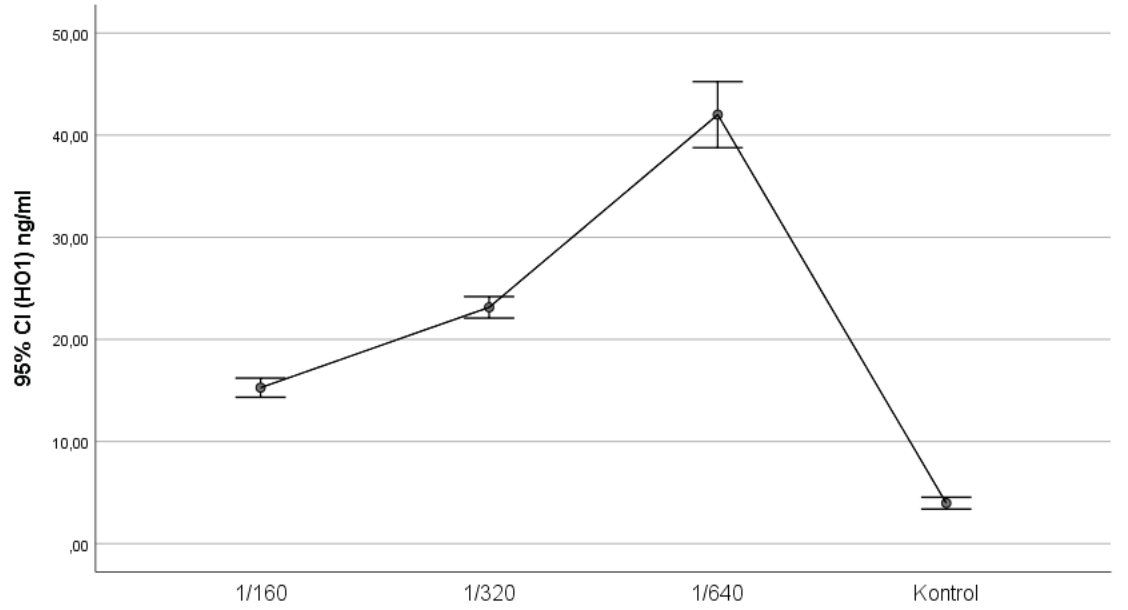
		p	0,096	0,628	.	0,310
	Neopterin (nmol/L)	r	-0,178	-0,027	0,192	1,000
		p	0,346	0,888	0,310	.
1/640	Yaş	r	1,000	0,064	0,021	0,284
		p	.	0,743	0,914	0,136
	(HO1) ng/ml	r	0,064	1,000	-0,058	-0,126
		p	0,743	.	0,765	0,514
	NRF2 (ng/ml)	r	0,021	-0,058	1,000	0,160
		p	0,914	0,765	.	0,408
	Neopterin (nmol/L)	r	0,284	-0,126	0,160	1,000
		p	0,136	0,514	0,408	.
Kontrol	Yaş	r	1,000	-0,110	-0,154	0,112
		p	.	0,562	0,416	0,557
	(HO1) ng/ml	r	-0,110	1,000	0,028	0,368*
		p	0,562	.	0,884	0,046
	NRF2 (ng/ml)	r	-0,154	0,028	1,000	0,003
		p	0,416	0,884	.	0,986
	Neopterin (nmol/L)	r	0,112	0,368*	0,003	1,000
		p	0,557	0,046	0,986	.

Spearman Korelasyon Analizi

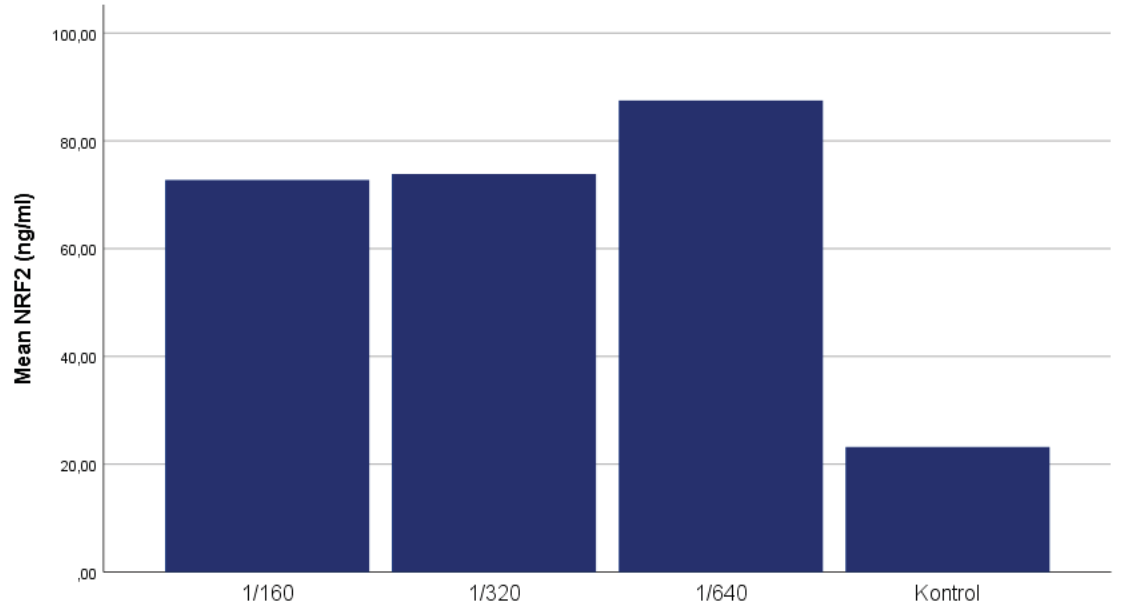
Her bir grup içerisinde değişkenler arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Araştırma sonucunda 1/160 titre grubunda (HO1) ng/ml ve NRF2 (ng/ml) arasında orta düzeyde, negatif yönlü ve anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($r=-0,407$; $p<0,05$). Ayrıca, kontrol grubunda, (HO1) ng/ml ve Neopterin (nmol/L) ölçümleri arasında düşük düzeyde, pozitif yönlü ve anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($r=0,368$; $p<0,05$) (Tablo 4.3.).



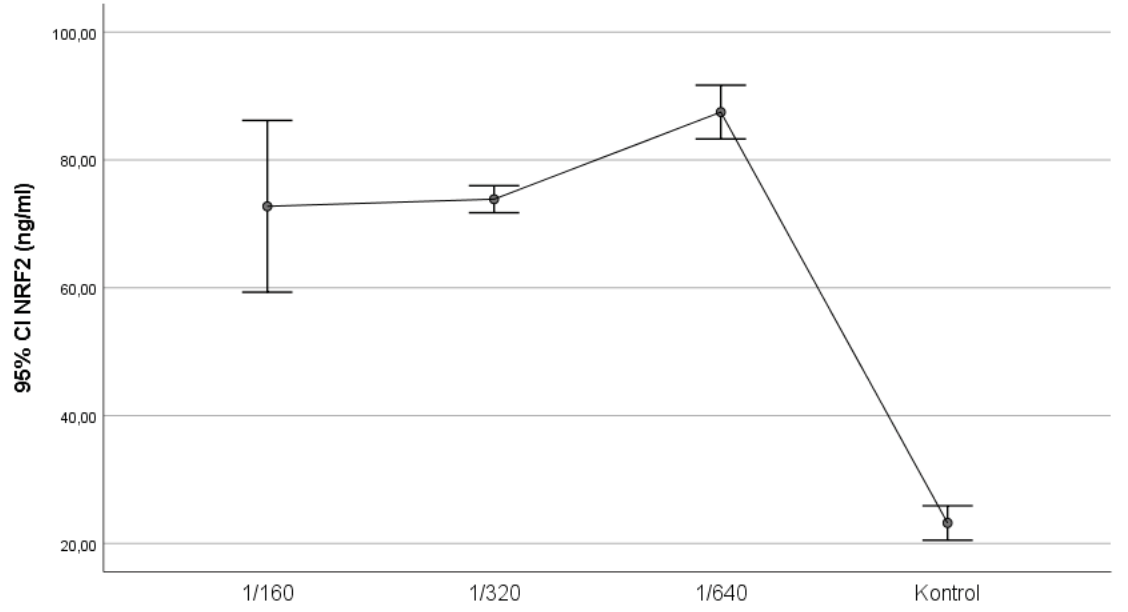
Şekil 4.3. Gruplara göre HO1 düzeyleri ortancaları



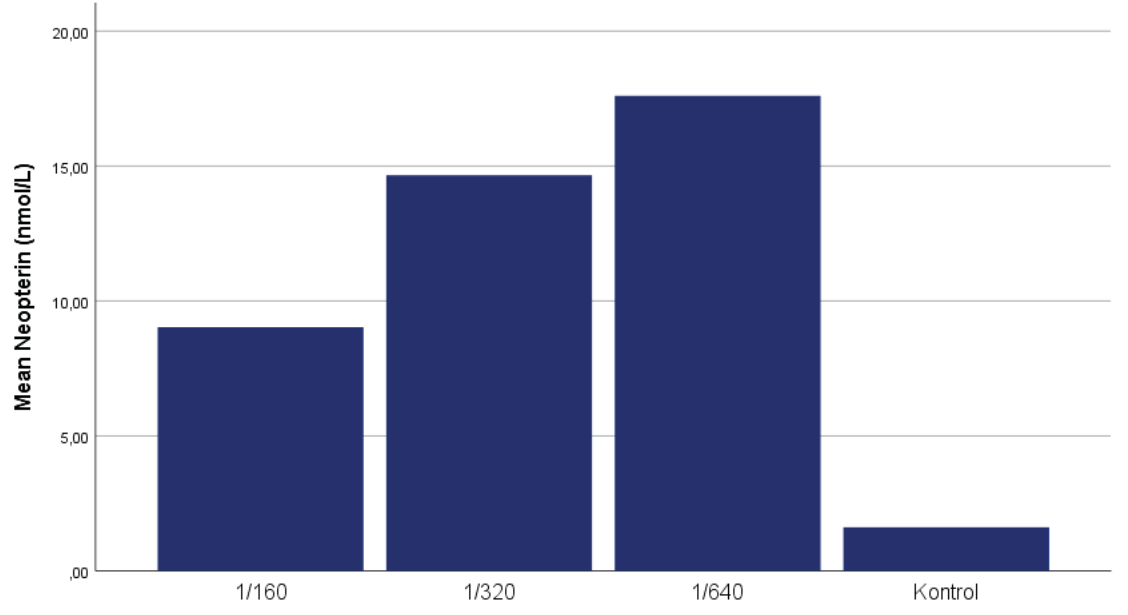
Şekil 4.4. Gruplara göre HO1 ölçüm ortancaları çizgi grafiği



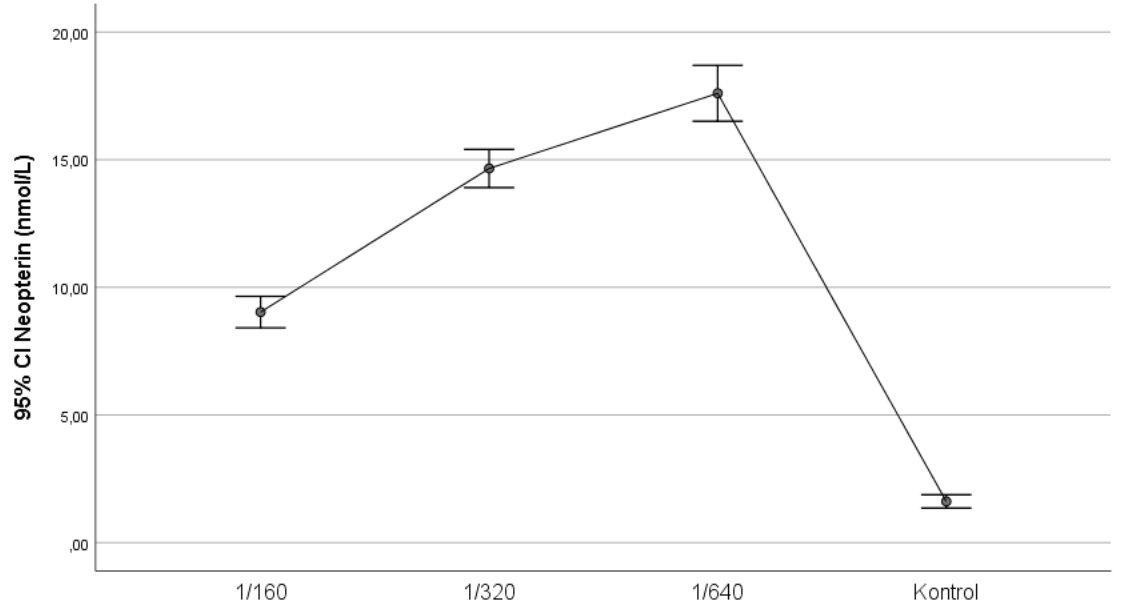
Şekil 4.5. Gruplara göre NRF2 düzeyleri ortancaları



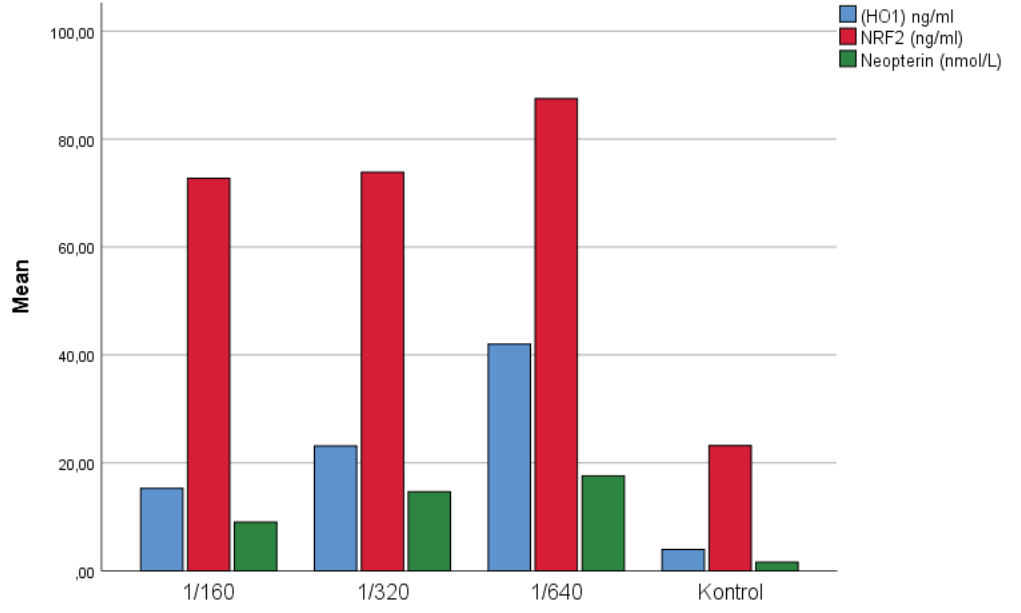
Şekil 4.6. Gruplara göre NRF2 ölçüm ortancaları çizgi grafiği



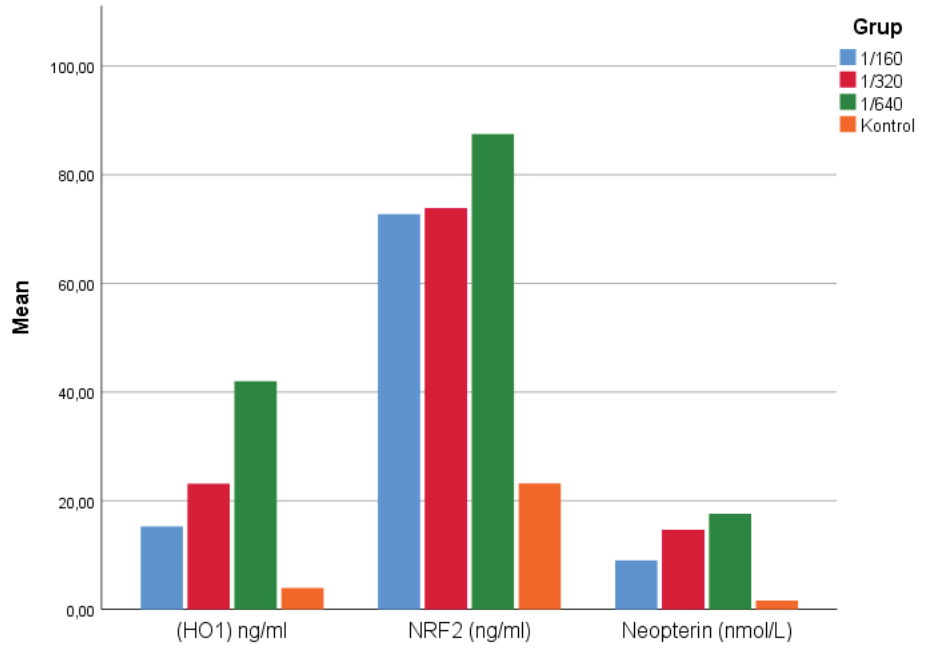
Şekil 4.7. Gruplara göre Neopterin düzeyleri ortancaları



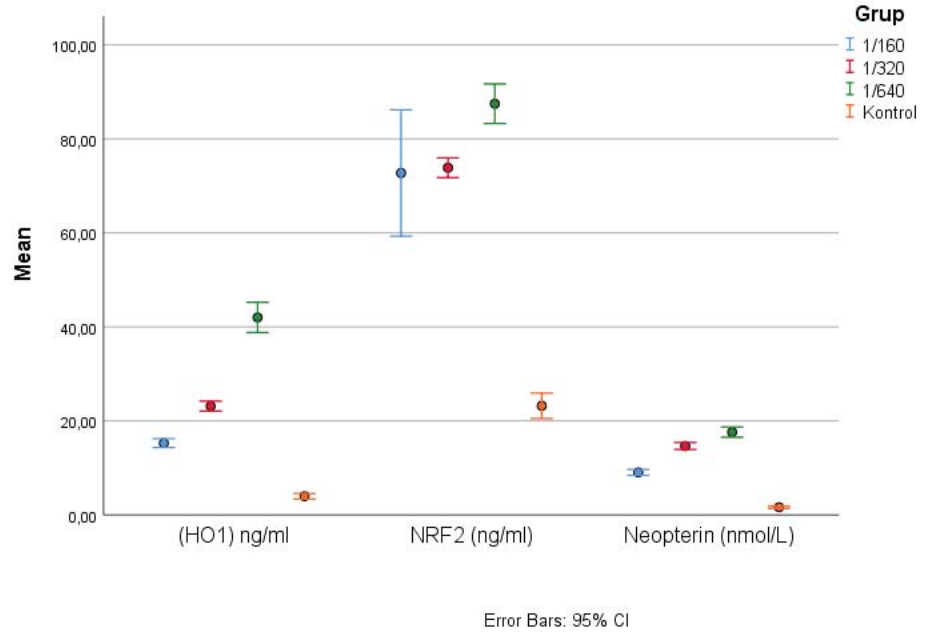
Şekil 4.8. Gruplara göre Neopterin düzeyleri ortancaları çizgi grafiği



Şekil 4.9. Gruplara göre HO1, NRF2, Neopterin düzeyleri ortancaları karşılaştırma grafiği



Şekil 4.12. Tüm değişkenlerin ölçüm ortancaları grafiği



Şekil 4.13. Tüm değişkenlerin ölçümlerinin ortalama Error Bars grafiği

5. TARTIŞMA

Bruselloz, Brusella cinsi bakterilerin sebebiyet verdiği, insanlara enfekte hayvanlardan direkt temas, inhalasyon veya et, süt ve süt ürünleri gibi hayvansal ürünlerin yenilerek tüketilmesi ile enfekte olunan bir hastalıktır (117).

Tekrarlayan tifo, tifo Malarya ateşi, tekrarlayan Akdeniz ateşi, ondulan ateş, Malta humması, Kıbrıs ateşi, Kırım ateşi, kaya ateşi ve Cebelitarık humması şeklinde de tanınan bruselloz; Brusella genusundaki türlerden (Brusella melitensis, B. abortus, B. suis, B. canis, B. ovis, B. neotomae, B. ceti ve B. pinnipediae) herhangi biriyle meydana gelen bir hastalıktır (118).

Ülkemizde bu etkenin bulunmasına yönelik ilk çalışmalar, 1915 yılında Kural ve Akalın'ın İstanbul'da yaşayan bir hastada, hastalığın tespitini yapmak amaçlı gerçekleştirmiş oldukları araştırmalarıyla başlamıştır. Sonrasında etken, Berke tarafından 1931 yılında sığırlarda, Gölem tarafından 1943 yılında koyun ve keçi türlerinde, Köylüoğlu ve Aktan tarafından da 1944 yılında Bandırma merinos çiftliğindeki koyunlarda tespiti yapılmıştır (68).

İnsan brusellozu vücuttaki herhangi bir organı ve vücut sistemini etkileyebileceğinden enfeksiyonun ortaya çıkan semptomları patognomonik değildir ve bu sebeple hastalık diğer tıbbi hastalıklarda kolaylıkla karıştırılabilir. Bu nedenle insanlarda brusellozun en doğru şekilde yapılan teşhisi, yalnızca erken ve yeterli hasta yönetimi için önemli olmakla kalmaz, aynı zamanda hasta hayvanlara maruz kalma, kontamine gıdaların (özellikle süt ürünleri) tüketimini, laboratuvar güvenlik uygulamalarının ihlalini ortaya çıkarabileceğinden halk sağlığı açısından ciddi bir öneme sahiptir.

İnsan brusellozunun mikrobiyolojik tanısı üç farklı modaliteye dayanır: kültür, seroloji ve nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT'ler)(82).

Bruselloz ile ilişkili en sık rastlanan semptomlar; yüksek ateş, artralji, miyalji, iştahsızlık ve terlemedir. En sık rastlanan komplikasyon ve bölgesel tutulum ise; kas-eklem tutulumu, genitoüriner sistem tutulumu ve cilt tutulumudur (73).

Bruselloza karşı etkin bir tedavi uygulamak için makrofajlara nüfuz eden ve asidik ortamda aktif olan antibiyotikler gereklidir (87).

NRF2, kritik bir redoks duyarlı transkripsiyon faktörüdür. Faz II detoksifiye edici enzimlerin ve antioksidan enzimlerin indüklenen ekspresyonunu düzenleyerek vücudun oksidatif stres durumunu iyileştirmek, hücrenin hayatta kalmasını teşvik etmek ve hücrelerin redoks homeostazını korumak için aktive edilir (10).

Proteinlerin ve enzimlerin iltihaplanmaya ve oksidatif strese karşı modülasyonu, antioksidan yanıt elemanlarının (ARE) transkripsiyonunu aktive eden ana eylem olarak bilinir. Aktif olmayan durumunda, Neh2 (NRF2-ECH homoloji-2) alanı ile Kelch benzeri ECH birleştirici protein-1 (KEAP1) ile etkileşime girer; reaktif oksijen türlerine (ROS) maruz kalmadığı sürece, ubiquitin-proteazom yolu ile degrade olur. NRF-2, enflamasyona veya oksidatif strese (OS) maruz kaldığında, fosforile olur ve çekirdeğe yer değiştirir, proteinlerin ve antioksidan enzimlerin transkripsiyonuna neden olur. NRF-2 yolu, kontrol altında tutulabilecek oksidatif strese karşı koruma sağlamak için gerekli bileşimlerle antioksidan mekanizmaya yardımcı olur (119).

ROS'un aşırı üretimi ve çeşitli endojen ve eksojen yaralanmalar ile iltihaplanma sebebiyle sürekli karaciğer hasarı, mitokondride solunum zincirindeki hasar, süperoksitdismutaz gibi antioksidan elementlerin azalması, katalaz aktivitesi veya lipidperoksidasyonunun artması, apoptoz, inflamasyon ve fibrozis ile ilgilidir (120,121).

Gupte ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışmada, alkolsüz steatohepatit (NASH) kriterlerinin görüldüğü karaciğer dokusunda NRF-2'nin aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir (122).

Otonom sinir sistemi (ANS), büyük ölçüde bilinçsizce hareket eden ve vücut fonksiyonlarını düzenleyen bir kontrol sistemidir. Oksidatif stresin neden olduğu ANS'nin işlev bozukluğunun enflamasyonu indüklediğini ve oksidatif stresin artmasına neden olarak homeostazın korunmasında ve düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. ANS tarafından tetiklenen birkaç sitokin, kendini savunma sürecinde yer alır. Çekirdekte nükleer faktör eritropoietin-2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2) aktive edildiğinde, katalaz, glutatyon (GSH) ve süperoksitdismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimlerin üretimini başlatır. Bu antioksidan enzimler saniyede bir milyona kadar serbest radikali nötralize eder. Bu durum oksidatif stres, inflamatuvar yanıt, nekroz, apoptoz, ferroptoz, alkaloptoz ve saatofajiyi azaltmak için etkili bir yaklaşımdır. İnsan vücudunun içinde sempatik sinir sistemi, parasempatik sinir sistemi ve ANS'yi oluşturan

enterik sinir sistemi olmak üzere üç sistemin var olması, bir organizma oksidatif strese zarar gördüğünde NRF2/HO-1 yolu gibi hayati yolların uyarılmasına yardımcı olur.

Oksidatif stres ikincil olarak sinapsları tetikler. Nöronlar arasındaki inhibitör ve uyarıcı sinapslar, ilgili yolların aktivasyonuna yol açabilecek sitokinleri serbest bırakarak iç sistemi kontrol etmede etkilidir. Enflamasyon ve oksidatif stres yoluyla ANS, homeostazın tekrar sağlanmasına yardımcı olur. Bu nedenle, ANS'nin etkileri NRF2/HO1 yolu ile ilişkilidir. Song ve arkadaşlarına göre ulinastatin (İYE), NRF2 aktivasyonu yoluyla CVB3'ün neden olduğu akut viral miyokardite karşı koruma sağlar (122).

Ayrıca, Ai ve ark. inflamatuvar oksidatif stres ve sitokin üretimini azaltarak baicalein tarafından inhibe edilebilen 12/15-lipoksijenazın (12/15-LO) yukarı regülasyonu nedeniyle NRF2 yolunun aşağı regüle edildiğini ortaya çıkardı (123,124). Tersine, Wang ve ark. immün ve inflamatuvar süreçlerin ayrıca NRF2'nin aktivasyonu için bir uyarıcı olarak işlev görebileceğini göstermişlerdir (125).

Bizim çalışmamızda da immün yanıt arttıkça Nrf-2 düzeyleri de artış göstermiştir.

NRF2'nin oksidatif stresini azalttığı ve tetrahedral DNA nanoyapılarının (TDN'ler) biyolojik olarak güvenli olduğu düşüncesini savunarak, Zhang ve ark. TDN'lerin, bir miyokard enfarktüsü yaralanmasından sonraki sonucu iyileştirmek için, çekirdeğe aktararak ve antioksidatif mekanizmalarda yer alan genleri yukarı doğru düzenleyerek NRF2 yolunu aktive edebildiğini bulmuşlardır (126).

Dong ve ark. H9C2 hücrelerinde NRF2 ekspresyonu inhibe edildiğinde, aldehitlerin artık oksidatif hasarı azaltmak için yeterli antioksidan enzimlerin üretimini uyardığını ve bunun da aritmi insidansının büyük ölçüde artmasına sebep olduğunu gösterdi (127).

Aksine, Enayati ve ark. Potentillareptans özütünün kardiyomyositlerin endojen antioksidan savunmasını doğrudan etkilediğini ve NRF2/HO1 sinyal eksenini yoluyla NO yolunu dolaylı yoldan aktifleştirdiğini, böylece aritmi ve miyokard enfarktüsünü hafiflettiğini bulmuştur (90).

NRF2 sinyal yolunun aktivasyonu oksidasyonu engelleyebilir ve serbest radikallerin üretimini azaltarak miyokarddaki oksidatif hasarı azaltabilir. Bugüne kadar yapılan araştırmalar hücre ve hayvan deneyleriyle sınırlı tutulmuştur. Klasik bir

sitoprotektif transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2'nin (Nrf-2) oksidatif hasara karşı koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir (94).

Nrf-2 ayrıca anti-inflamatuar etkilere sahip olabilir ve fare modellerinde hava yolu hasarına karşı korur ve Nrf-2 aktivatörleriyle şu anda nörodejeneratif hastalıkları tedavi etmek için klinik deneyler yapılmaktadır (128).

Bazı çalışma sonuçlarına göre Nrf-2 hücre hasarını, oksidatif stresi azalttığını ve tümör oluşumunun baskılanmasıyla sonuçlanan bir anti-inflamatuar fonksiyon uyguladığı görülmüştür (13).

Bizim çalışmamızda amaçladığımız brusellozlu hastalarda NRF2 düzeylerinin 1/160, 1/320, 1/640 ve sağlıklı kontrol grubundaki bireylerdeki değişimini incelemektir. İstatistiksel analizler sonucunda NRF2 ölçüm düzeyleri gruplara göre anlamlı olarak değişmektedir ($p < 0,05$). NRF2 (ng/ml) ölçümü açısından kontrol grubu ($23,20 \pm 7,22$) diğer gruplardan anlamlı derecede düşüktür, 1/320 ($73,85 \pm 5,66$) grubu ise 1/160 ($72,74 \pm 35,99$) ve 1/640 ($87,48 \pm 11,27$) gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. NRF2 ölçüm düzeyleri en yüksek 1/640 grubunda bulunmuştur. Sonuçların bu şekilde çıkması oksidatif stresi baskılayan NRF2 nin anti-inflamatuar bir etki gösterdiğini bize düşündürmektedir. Titrelere eklenen antijen miktarlarına göre antikorlarla oluşturduğu çökelekler varsayılarak titreler arttıkça oluşan immün yanıtın fazla olduğu düşünülebilir. İmmün yanıtın fazla olması NRF2 nin fazla olmasıyla koreledir. Brusellarelapsında ve brusella testlerinin yapılamadığı zamanlarda hastanın NRF2 düzeyine bakılarak hastalık hakkında çıkarımda bulunulabilir.

Neopterin ilk olarak 1967'de insan idrarından izole edilmiştir ve enfeksiyon ve hastalığın tanısında bir biyobelirteç olarak kullanılmıştır. Fiziksel travma, kardiyovasküler hastalık, kanser, bakteriyel, paraziter enfeksiyonlar ve viral enfeksiyonların bir sonucu olarak ortaya çıkan klinik enflamasyonun düzeyi genellikle plazma ve idrar neopterin konsantrasyonu ölçülerek değerlendirilir (96).

Neopterin, hücre aracılı bağışıklık ile ilişkili bir biyokimyasal belirteçtir. Serum neopterin seviyesi, çeşitli hastalıkların patogeneğinde ve ilerlemesinde önemli olan hücresel bağışıklık sisteminin aktivasyon aşamasını gösterir (129).

Neopterin (1', 2', 3'-D-eritro-trihidroksipropilpterin), pteridin ailesine aittir ve vücutta çeşitli oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında rol oynar. Neopterin, in vivo olarak guanozintrifosfattan (GTP) türetilir. Reaksiyon, aktive monositler,

makrofajlar, dendritik hücreler ve endotelial hücrelerde GTP-siklohidrolaz-I (GCH I) enzimi tarafından, esas olarak IFN- γ tarafından uyarıldıktan sonra katalize edilir. T lenfositler ve doğal öldürücü hücreler tarafından salınan sitokinlere yanıt olarak makrofajlar tarafından salınması, neopterin hiper-enflamasyon ile sıkı bir şekilde ilişkili olan hücre aracılı bağışıklığın aktivasyonunun bir göstergesi yapar. Bu sebeple, neopterin ölçümü, viral saldırı ve sitokin fırtınası sırasında meydana gelen yüksek ve muhtemelen sürekli bir bağışıklık aktivasyonunu yansıtır.

Yapılan çalışmalar sonucu neopterin SARS-CoV ile enfekte hastaların klinik ilerlemesi ile ilişkili olduğu ve SARS-CoV enfeksiyonu sırasında gözlenen plazmatik seviyelerin, viremiden bağımsız olarak solunum yolu sendromlarının şiddetini öngördüğü açıklanmıştır (130).

Neopterin, guanozintrifosfat (GTP) katabolizmasının sonucu olarak oluşan bir pürin nükleotididir. Patolojilerde ve aktive edilmiş hücreli bağışıklık mekanizmaları ile seviyeler yükselir. Th1 lenfositleri tarafından salgılanan interferon gama (IFN- γ) tarafından aktive edilen monositler, makrofajlar, dendritik hücreler ve endotelial hücrelerden salgılanır. Bu moleküle tanısal bir biyobelirteç olarak artan bir ilgi vardır çünkü bazı hastalıklarda (otoimmün, inflamatuvar ve malign tümöral patolojiler) seviyeleri artar ve çalışmalar, özellikle viral enfeksiyonların erken evrelerinde (örn., EBV) artan düzeyler bildirmiştir (13).

Üriner neopterin, invaziv kan toplama gereksinimini de ortadan kaldıran bir inflamasyon belirteci olarak yaygın şekilde kullanılmıştır (131). Neopterin enfeksiyonlar, otoimmün bozukluklar ve kanser dahil olmak üzere birçok inflamatuvar durumda görülen yüksek konsantrasyonlara sahip iyi bilinen bir immün aktivasyon belirteçidir. Sitomegalovirüs hastalığı, kızamıkçık ve dang humması gibi akut viral enfeksiyonlarda, serum neopterin seviyeleri hastalığın aktivitesi ile ilişkilidir ve antikor üretiminden önce saptanabilir. Neopterin yükselmesi esas olarak insan monosit türevli makrofajlar tarafından artan sentezden kaynaklanır, burada interferon-gama (IFN- γ) en merkezi aktive edici sitokindir (131).

Robertson ve ark.'nın yaptığı çalışmada hastaneye yatırılan COVID-19 hastalarıyla ilgili yakın tarihli bir rapor, ağır vakalarda neopterin düzeylerinin hafif vakalara kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir (132).

Literatürde, HIV enfeksiyonu için prognostik belirteç olarak neopterin kullanan bazı çalışmalar vardır ve bu çalışmaların çoğu HIV enfeksiyonu olan kişilerde HIV enfeksiyonu olmayan hastalara göre neopterin düzeylerinde bir yükseliş olduğunu göstermiştir (133).

Yapılan çalışmalarda, viral enfeksiyonlar sırasında, artan neopterin seviyeleri hastalık aktivitesi ile korele bulunmuş ve ilgili çalışmaların çoğunda kuluçka döneminin sonunda ve klinik semptomların başlangıcından önce yüksek neopterin seviyeleri tespit edilmiştir (134).

Immanuel ve ark. tüberkülozlu HIV seropozitif ve seronegatif hastalarda serum neopterin konsantrasyonlarını antitüberküloz tedavisi öncesinde, sırasında ve sonunda ölçtüler. HIV ile enfekte asemptomatik bireylerin serum neopterin seviyeleri sağlıklı kontrollerden daha yüksek, ancak HIV-TB hastalarından daha düşük bulunmuştur. Neopterin düzeylerinin anti-tüberküloz tedavisi ile azaldığı sonucuna varmışlardır; sürekli yüksek neopterin seviyeleri, ilerleyici bir HIV hastalığına ve kötü bir prognoza işaret eder (135).

Yine benzer sonuçlara sahip başka bir çalışmada, araştırmacılar neopterin HIV tedavisini ve hastalığın ilerlemesini izlemede yararlı bir belirteç olduğu sonucuna varmışlardır (136).

Bipath ve diğerleri, 105 HIV/AIDS hastasında yaptıkları çalışmada plazma neopterin inflamatuvar aktivite, inflamasyonla ilişkili komorbiditeler ve immün yetmezlik derecesinin iyi bir göstergesi olduğu sonucuna varmıştır. Neopterin düzeylerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğunu saptamışlardır ($p < 0,001$) toplam hasta grubu arasında kontrol grubuna kıyasla ve neopterin ile inflamasyonun plazma göstergeleri arasındaki anlamlı korelasyonlar, neopterin aktif inflamatuvar durumun bağışıklık sistemi üzerindeki etkisinin iyi bir göstergesi olduğunu gösterdi (137).

Michael Eysenck ve ark., aktif tüberküloz hastalarında idrar neopterin seviyelerinin geç enfekte kişilere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır (138). Ray ve ark. ve Kaski ve ark. yüksek neopterin seviyelerinin kardiyovasküler olayların güçlü bir bağımsız öngörücüsü olduğunu gösterdi (139).

Kajiya ve arkadaşları, 20 influenza hastasından oluşan küçük bir kohortta, neopterin seviyelerini ölçmüş ve semptom başlangıcında (48 saat içinde) hastaların %80'inde normalin üst sınırı görülmüş. İyileşme sırasında (5 ve 14. günler arasında),

neopterinde hızlı bir düşüş gözlemlenmiş ve 14. günden sonra tüm hastalarda normal neopterin seviyeleri bildirilmiştir (103).

Bizim çalışmamızda amaçladığımız brusellozlu hastalarda neopterin düzeylerinin 1/160, 1/320, 1/640 ve sağlıklı kontrol grubundaki bireylerdeki değişimini incelemektir. İstatistiksel analizler sonucunda neopterin ölçüm düzeyleri gruplara göre anlamlı olarak değişmektedir ($p < 0,05$). Neopterin (nmol/L) ölçümü açısından kontrol grubu ($1,61 \pm 0,70$) diğer gruplardan anlamlı derecede düşüktür, 1/320 ($14,66 \pm 2,00$) grubu ise 1/160 ($9,03 \pm 1,65$) ve 1/640 ($17,60 \pm 2,94$) gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Neopterin ölçüm düzeyleri en yüksek 1/640 grubunda bulunmuştur. Sonuçların bu şekilde çıkması bağışıklık aktivasyonunu sağlayan bir biyobelirteç olan neopterin anti-inflamatuar bir etki gösterdiğini ve immün yanıt olarak hastalığın şiddet belirteci gibi algılanabileceğini bize düşündürmektedir. Yukarıda belirtilen çalışmalar neopterin hastalıklar karşısında oksidatif stresi azaltıcı bir immün yanıt sistemi olduğunu göstermektedir ve bizim çalışmamızda da çıkan sonuçlara göre bu çalışmalarda benzer sonuçlar görülmektedir. İmmün yanıtın fazla olması neopterin fazla olmasıyla koreledir. Brusellarelapsında ve brusella testlerinin yapılamadığı zamanlarda hastanın neopterin düzeyine bakılarak hastalık ve hastalığın iyileşme süreci hakkında çıkarımda bulunulabilir. Hatta tedavi sonucunda neopterin seviyeleri incelenerek hastalık değerlendirilmesi yapılabilir.

Heme oksijenaz-1 (HO1), oksidatif ve inflammatuar hasarlar sonucu ortaya çıkan hastalıklarda ana proteindir (107). HO1, biyolojik sistemlerde hipoksi, oksidatif stres, sitokinler, LPS, ağır metaller gibi bir dizi uyaranlara karşı yanıt olarak indüklenir. HO1 indüksiyonu, hücreler tarafından çeşitli stres koşullarını nötralize etmek için kullanılan yaygın olarak kabul edilen bir strateji olduğundan, bu güçlü enzimin hedeflenen indüksiyonu, uygun olmayan bağışıklık tepkisi ve oksidatif düzensizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkan farklı hastalıklara karşı faydalı bir terapötik strateji olarak kabul edilebilir (112).

Merkezi bir demir atomuna sahip olan hem, serbest radikal üreten reaksiyonların bir pro-oksidanı ve katalizörü olarak bilinir (116). HO1'in genel bir sitoprotektif mekanizma olarak önemi HO1 eksikliği olan hücre ve hayvanların yanı sıra oksidatif strese ve ilişkili hastalıklara karşı artan duyarlılık gösteren HO1 eksiklikleri veya bozuklukları olan hastalarda yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır (140).

HO1 birçok kanserde pro-tümörjenik etkiler göstermiştir. HO1'in tümör hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü arttırdığı ve kanser hücrelerini apoptoz ve otofajiden koruduğu gösterilmiştir. Kan damarı oluşumunun düzenlenmesi ve pro-anjiyogenik faktörlerin ekspresyonundaki yükseliş de HO1'e bağlı şekilde düzenlenir. Prostat kanseri, böbrek kanseri, glioma, melanom, pankreas kanseri, Kaposi sarkomu ve diğerleri dahil olmak üzere birçok tümör için tümörlerin ilerlemesi ile artan HO1 ekspresyonu arasındaki pozitif korelasyon kaydedilmiştir.

HO1'in sadece tümör öncesi etkileri tarif edilmekle kalmaz; HO1, antioksidan ve genom koruyucu aktiviteleri nedeniyle kanserojenlere karşı koruyucu etkiler gösterebilir ve tümör başlama ihtimalini azaltabilir. Bununla uyumlu olarak, HO1'in sağlıklı dokuları skuamöz hücreli karsinomun kimyasal indüksiyonuna karşı koruyabildiğini, ancak büyümeye devam eden tümörlerde HO1'in daha malign formlara doğru ilerlemesini hızlandırdığı gözlemlenmiştir (141).

Mendivil ve ark. nın yaptığı bir çalışmada enflamatuar bir zorluğa maruz kalan yaşlı farelerde mikrogial HO1 azalmasının, beyindeki demir birikintilerinin azalmasını içeren bir mekanizma tarafından olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Bu bulgu, HO1 indüksiyonunun antioksidan ve antiinflamatuar özelliklerinden dolayı faydalı etkilerinin olabileceği genel fikrine ters düşer ve bu enzimin sıkı bir şekilde düzenlenmesinin önemini vurgular (106).

Heme oksijenaz-1 (HO1), oksidatif stres, hücre hasar ve hastalıklar gibi elektrofilik uyarılara yanıt veren bir faz II enzimidir. HO1, çeşitli insan malignitelerinde artar bu da kanser hücresi büyümesi, anjiyogenez ve metastaz için tümör mikro ortamının yerleşmesine katkısını ve ayrıca kemoterapi ve radyasyon tedavisine direnci gösterir. Buna karşılık, tümör hücrelerinde HO1'in artırılmış ifadesi, birçok kanserde hücre ölümünde artışa neden olabilir (142).

Farklı kanser türlerinde yüksek düzeyde HO1 ekspresyonu gösterilmiştir (143,144) ve antikanser tedavisine direnç, HO1'in duyarlı bir yukarı regülasyonu ile ilişkili görülmüştür (145).

Yapılan çalışmalara rağmen, genetik ve farmakolojik yaklaşımlar, kanser hücresi ölümünde ferroptotik süreçte HO1 aktivasyonunun kritik rolünü göstermiştir (146).

Klinik vakalarda, daha yüksek HO1 ekspresyonu olan hastalar daha düşük sağkalım oranı ve kötü sonuçlar göstermiştir (147).

Brusella enfeksiyonu sırasında immün kaçınma stratejilerinin aydınlatılması, brusellozun kontrolünü kolaylaştırır. Konak enzim, HO1 inflamatuvar hastalıklar ve mikrobiyal enfeksiyonlar sırasında etkili olan çok işlevli bir proteindir. Bir çalışmada Brusella enfeksiyonu sırasında HO1'in rolü değerlendirilmiş ve Brusella enfeksiyonu makrofajlarda HO1 ekspresyonunu indüklediği, ayrıca HO1'in makrofajlarda PI3K, AMPK kinaz ve nükleer eritroid ile ilişkili faktör 2 (NRF2) tarafından düzenlendiği bulunmuştur. İlginç bir şekilde, HO1'i devre dışı bırakmak veya HO1'in aktivitesini inhibe etmek, Brusella hücre içi büyümesini önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (147).

Bizim çalışmamızda amaçladığımız brusellozlu hastalarda HO1 düzeylerinin 1/160, 1/320, 1/640 ve sağlıklı kontrol grubundaki bireylerdeki değişimini incelemektir. İstatistiksel analizler sonucunda hemoksijenaz ölçüm düzeyleri gruplara göre anlamlı olarak değişmektedir ($p < 0,05$). Hemoksijenaz (ng/ml) ölçümü açısından kontrol grubu ($3,96 \pm 1,55$) diğer gruplardan anlamlı derecede düşüktür, 1/320 ($40,17 \pm 14,95$) grubu ise 1/160 ($15,27 \pm 2,52$) ve 1/640 ($42,01 \pm 8,65$) gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Hemoksijenaz ölçüm düzeyleri en yüksek 1/640 grubunda bulunmuştur. Sonuçların bu şekilde çıkması oksidatif ve inflamatuvar hastalıklar sonucu ortaya çıkan hemoksijenazın yukarıda belirtilen çeşitli hastalıklarla ilgili çalışmalarla uyumlu olduğu saptanmıştır. 2021 yılında brusellozlu hastaların hemoksijenaz aktivasyonu ile ilgili yapılan ve yukarıda belirttiğimiz çalışmada ise bizim çalışmamıza destek olarak hemoksijenaz enziminin aktivasyonunun azaltılması brusella büyümesini de azalttığı ve enzim miktarıyla hastalık düzeyinin korele olduğu saptanmıştır. Titrelerin antijen-antikor düzeyleriyle olan bağlantısı baz alınır ise 1/640 grubundaki hemoksijenaz ölçüm düzeylerinin diğer gruplardan fazla olması bu enzimin anti-inflamatuvar ve anti-oksidan bir enzim olduğunu bize yinelemektedir. Brusella relapsında ve brusella testlerinin yapılmadığı zamanlarda hastanın hemoksijenaz düzeyine bakılarak hastalık hakkında çıkarımda bulunulabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda brusella hastalarında NRF2, HO1 ve Neopterin seviyeleri en düşük sağlıklı kontrol grubundaki bireylerde bulunurken en yüksek 1/640 titre grubunda bulunmuştur. Bu durum bize bu biyobelirteçlerin hastalıklar karşısında oksidatif stresi azaltıcı, anti-inflamatuar etki gösteren bir immün yanıt sistemi olduğunu göstermektedir. İmmün yanıtın fazla olması bu üç biyobelirtecin fazla olmasıyla koreledir. Brusella relapsında ve brusella testlerinin yapılamadığı zamanlarda hastanın bu belirteçlerin serum düzeylerine bakılarak hastalık ve hastalığın iyileşme süreci hakkında çıkarımda bulunulabileceğini düşündürmektedir. Hatta tedavi sonucunda bu seviyeler incelenerek hastalık değerlendirme yapılabileceğini düşünmekteyiz. Bu konuyla ilgili kapsamlı çalışmalar yapılarak test maliyetleri ve hastalığın tanı ve tedavisine katkı sağlayabilecek yeni çalışmalar yapılabilir. Bizim çalışmamızın da yapılacak bu çalışmalara ve brusella literatürüne katkı sağlayabileceğini ümit ediyoruz.

7. KAYNAKLAR

- 1) Bowman DD. Introduction to the alpha-proteobacteria: Wolbachia and Bartonella, Rickettsia, Brucella, Ehrlichia, and Anaplasma. *Top Companion Animal Medicine* 2011;26(4): p.173-177.
- 2) Njeru J, Wareth G, Melzer F, Henning K, Pletz MW, Heller R et al. Systematic review of brucellosis in Kenya: disease frequency in humans and animals and risk factors for human infection. *BMC Public Health* 2016;16(1): p.1-15.
- 3) Corbel MJ, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization & World Organisation for Animal Health. *Brucellosis in humans and animals*. World Health Organization 2006. p. 26-32.
- 4) Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2006 Feb;6(2): p.91-99.
- 5) Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Henk L. Human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2007 Dec;7(12): p. 775-786.
- 6) Glowacka P, Zkowska D, Naylor K, Niemcewicz M, Bielawska AD. Brucella – Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment, *Pol J Microbiology*. 2018 Jun; 67(2): p. 151–161
- 7) Jay M, Freddi L, Mick V, Durand B, Girault G, Perrot L et al. Brucella microti-like prevalence in French farms producing frogs, *Transbound Emerg Dis*. 2020 Mar;67(2): p. 617-625.
- 8) Şimşek F, Kantürk A, Bruselloz, *Okmeydanı Tıp Dergisi* 2016; 32(Ek sayı): s. 46-49.
- 9) Mirnejad R, Jazi FM, Mostafaei S, Sedighi M. Molecular investigation of virulence factors of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains isolated from clinical and non-clinical samples. *Microb Pathog*. 2017 Aug;109: p. 8-14.
- 10) Solano-Urrusquieta A, Morales-Gonzalez JA, Castro-Narro GE, Cerda-Reyes E, Flores-Rangel PD, Fierros-Oceguera R. NRF-2 and nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology* 2020; 19(5), p. 458-465.

- 11) Gall T, Balla G, Balla J. Heme, heme oxygenase, and endoplasmic reticulum stress-a new insight into the pathophysiology of vascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20(15): p: 3675.
- 12) Manukyan MN, Yavuz Y, Erbarut İ, Veliöglü Öğünç A, Ataizi Çelikel Ç, Yalçın AS, Güllüoğlu BM. Sıçanlarda whey proteini ile oluşturulan glutatyonönkoşullandırılmasının karaciğer sıcak iskemi/reperfüzyon hasarında hem oksijenaz-1 sistemi üzerine etkisi. *Ulusal Cerrahi Dergisi* 2008; 24(3): s. 137-144.
- 13) Giesege SP, Parker GB, Lindsay A. Neopterin, Inflammation, and oxidative stress: what could we be missing? *Antioxidants*, 2018; 7:p. 80.
- 14) H. Brucella. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi 2004; p. 157-168.
- 15) Sümerkan B. Brucella türleri. İçinde: Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (ed.). Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. s. 1647-1652.
- 16) Shakir RA, Brucellosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 420: jan 15 2021. URL: [https://www.jns-journal.com/article/S0022-510X\(20\)30616-X/fulltext#relatedArticles](https://www.jns-journal.com/article/S0022-510X(20)30616-X/fulltext#relatedArticles)
- 17) Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley TT, Williams ST. *Bergey's manuel of determinative bacteriology*. 9th. Edi. Baltimore, USA 1994; p. 547-557.
- 18) Corbel MJ. Microbiological aspects, In: Madkour MM, Madkour's Brucellosis, New York: Springer-Verlag 2001; p. 51-64.
- 19) Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Karaman M, Akay Ö ve ark. *Özel Mikrobiyoloji*. 4. Baskı, Medisan, Ankara 1997; s. 43-59.
- 20) Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal Ö, Paracıklioğlu J, Akan M. *Veteriner Mikrobiyoloji Bakteriyel Hastalıklar*. İlke-Emek Yayınları. Ankara 2006; s. 145-163.
- 21) Arenas-Gamboa AM, Ficht TA, Davis DS, Elzer PH, KahlMcDonagh M, Wong-Gonzalez A, Rice-Ficht AC. Oral vaccination with microencapsuled strain 19 vaccine confers enhanced protection against Brucella abortus strain 2308 challenge in red deer (*Cervus elaphus elaphus*). *Wildl Dis*. 2009;45(4):p. 1021-1029.

- 22) Schutze GE, Jacobs RF. Brusella. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, (ed). Nelson Textbook of Pediatrics 18th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company 2007: p. 1214-1216.
- 23) Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö, (ed.) Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi 1999: s. 571-577.
- 24) Koçoğlu E, Karabay O, İnce N. Bruselloz için serolojik taramanın değeri. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2008; 38(1): s. 23-26.
- 25) Erdenliğ S, Şen A. Koyun atıklarından izole edilen Brusella cinsi mikroorganizmaların izolasyonu ve biyotiplendirilmesi. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2000; 31(2): s. 31-42.
- 26) Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi 2004; s. 199-204
- 27) Lindquist D, Chu C, Probert Franciella S. Brucella. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover R (eds). Manual of Clinical Microbiology, Washington DC 2009; p. 824- 834.
- 28) Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis--new aspects of an old disease. Journal of Applied Microbiology 2005;98(6): p. 1270–1281.
- 29) Sriranganathan N, Seleem MN, Olsen SC, Samartino LE, Whatmore AM, Bricker B et al. Genome mapping and genomics in animal-associated microbes. In: Nene V, Kole C. (eds.), Brucella. Springer; (Chapter 1), Berlin Heidelberg 2009; p. 1-64.
- 30) Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li L-L, Kapur V, Alt DP, Olsen SC.. 2005. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. J Bacteriol. 187(8):2715–2726.
- 31) Chauhan HC, Patel BK, Chandel BS, Patel KB, Patel AC, Shrimali MD et al. Complete genome sequence of *Brucella abortus* SKN 13 isolated from placenta of aborted cattle in Gujarat, India. Genome Announc. 2016; 4(5): URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/genomeA.01123-16>
- 32) Mizak L, Gryko R. Parasion S, Kwiatek M. 2014. Brucellosis – a worldwide zoonosis. Polish Zyc. Wet. 2014; 89(1): p. 35–40.
- 33) Köhler S, Foulongne V, Ouahrani-Bettache S, Bourg G, Teyssler J, Ramuz M et al. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the

- environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99(24): p. 15711–15716.
- 34) Garrity G, Holt J. Taxonomic outline of the Archaea and Bacteria. In: Boone DR, Castenholz RC (eds). Bergey's Manual of systematic Bacteriology, New York, Springer-Verlag 2001; p. 155-166.
- 35) Büyükbaki HG. Brusella ile enfekte koyunlarda Haptoglobin ve serum Amiloid A düzeyinin belirlenmesi. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü: Kars Kafkas Üniversitesi 2020.
- 36) Copin R, Vitry MA, Hanot Mambres D, Machelart A, De Trez C, Vanderwinden JM, Magez S, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, et al. In situ microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. PLoS Pathogens 2012;8(3): [URL:https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002575](https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002575)
- 37) Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. Infect Ecol Epidemiol. 2018 Jul 24;8(1):1500846. doi: 10.1080/20008686.2018.1500846. eCollection 2018. PMID: 30083304
- 38) Gopalakrishnan A, Dimri U, Saminathan M, Yattoo M, Priya GB, Gopinath D et al. Virulence factors, intracellular survivability and mechanism of evasion from host immune response by Brucella: an overview. JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences 2016; 12(26): p. 1542-1551.
- 39) Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. Clinical Microbiology Reviews 2003; 16(1): p. 65–78.
- 40) Dadar M, Tiwari R, Sharun K, Dhama K. Importance of brucellosis kontrol programs of livestock on the improvement of one health. Veterinary Quarterly 2021; 41(1): p.137–151.
- 41) Wahab T, Skarp A, Baverud V, Kaden R. GFeGSH: a new genomic island might explain the differences in *Brucella* virulence. OJAS 2017; 7(02):p. 141–148.
- 42) Bano Y, Lone S. 2015. Brucellosis: an economically important infection. J Med Microbiol Diagn. 2015; 4 (4): p. 208.

- 43) Barrionuevo P, Giambartolomei GH. Inhibition of antigen presentation by Brucella: many more than many ways. *Microbes Infect.* 2019; 21(3–4): p. 136–142.
- 44) Yin D, Bai Q, Li L, Xu L, Xu K, Li J. 2019. Antigenicity and potential use of a novel brucella multiepitope recombinant protein in the diagnosis of brucellosis. *BioRxiv* 2019; p. 2-18. URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/786343v1>
- 45) Mancilla M. Smooth to rough dissociation in Brucella: the missing link to virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016; 5:98.
- 46) Jezi FM, Razavi S, Mirnejad R, Zamani K. Immunogenic and protective antigens of Brucella as vaccine candidates. *Comp Immunol Microbiol Infect Diseases* 2019; 65: p. 29–36.
- 47) Christopher S, Umapathy B, Ravikumar K. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *J Lab Physicians* 2010; 2(2): p. 55–60.
- 48) Atluri VL, Xavier MN, De Jong MF, Den Hartigh AB, Tsolis RM. Interactions of the human pathogenic Brucella species with their hosts. *Annu Rev Microbiol.* 2011; 65: p. 523–541.
- 49) Pei J, Turse JE, Wu Q, Ficht TA. Brucella abortus rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage. *Infection Immunology* 2006; 74:p.2667–2675.
- 50) Moreno E, Moriyon I. Brucella melitensis: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc. Natl. Acad. Science U.S.A.* 2002; 99:p. 1–3
- 51) Baysal B. Brucella, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi İstanbul 1999; 1: s. 571–577
- 52) Cloeckert A, Vizcaino N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of Brucella spp.: past, present and future. *Vet Microbiology,* 2002; 90: p.229-247.
- 53) Minnick MF, Stiegler GL. Nucleotide sequence and comparison of the 5S ribosomal RNA genes of Rochalimaea henselae, R. quintana and Brucella abortus. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(10): p. 2518.

- 54) Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor, *Curr. Opin. Microbiology*. 2005; 8(1): p. 60–66.
- 55) Wilson GS, Miles AA. The serological differentiation of smooth strains of the Brucella group, *Br. J. Exp. Pathol*. 1932; 13(1): p. 1.
- 56) Madkour. MM. Brucelloz: Genel Bakış, Madkour MM. (ed). Bruselloz. Ankara Nobel Kitap Evi 2008; pp. 1–20.
- 57) Doganay M, Aygen B, Human brucellosis: an overview, *Int. J. Infect. Diseases* 2003;7(3): p. 173–182.
- 58) Koneman EN, Allen SD, Janda WM, et al. Miscellaneous Fastidious Gram-Negative Bacilli, In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th (ed). Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia 2006;p. 482-491, 2006.
- 59) Dadar M, Shahali Y, Whatmore AM. Human brucellosis caused by raw dairy products: A review on the occurrence, major risk factors and prevention. *International Journal of Food Microbiology* 2018; 292:p. 39–47.
- 60) Dadar M, Alamian S, Behrozikhah AM, Yazdani F, Kalantari A, Etemadi A, Whatmore AM. Molecular identification of Brucella species and biovars associated with animal and human infection in Iran. *Veterinary Research Forum* 2019; (4):p. 315–321.
- 61) Godfroid J. Brucellosis in livestock and wildlife: Zoonotic diseases without pandemic potential in need of innovative one health approaches. *Archives of Public Health* 2017; 75(1): p. 34.
- 62) Godfroid, J. Brucella spp. at the wildlife-livestock interface: an evolutionary trajectory through a livestock-to-wildlife “Host Jump”? *Veterinary Sciences* 2018; 5(3):p. 81.
- 63) De Massis F, Zilli, K, Di Donato G, Nuvoloni R, Pelini S, Sacchini L, Di Giannatale E. Distribution of Brucella field strains isolated from livestock, wildlife populations, and humans in Italy from 2007 to 2015. *PLoS One*, 2019; 14(3): URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0213689>
- 64) Franc K, Krecek R, Hasler B, Arenas-Gamboa A. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: A call for interdisciplinary action. *BMC Public Health* 2018; 18(1), p. 125.

- 65) Dadar M, Shahali Y, Wareth G. Molecular diagnosis of acute and chronic Brucellosis in humans. In P. K. Arora (ed.). *Microbial technology for the welfare of society, microorganisms for sustainability*, Singapore: Springer 2019; p. 223–245.
- 66) De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Helsel LO, Whatmore AM. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46(1), p. 43–49.
- 67) Gültekin, E. Brucelloz ön tanılı hastaların serumlarında *brucella* antikorlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan çeşitli serolojik yöntemlerin karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Erzurum 2012; s. 1-52.
- 68) Yagupsky P, Morata P, Colmenero JD. Laboratory diagnosis of human brucellosis. *Clinical Microbiology Reviews* Nov 2019;33(1). URL: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/CMR.00073-19>
- 69) Tang L, Liu J, Wang Y, Zhang H, Chen C. Evaluation of a hypervariable octameric oligonucleotide fingerprints assay for identification of and discrimination between wild-type and vaccine strains of *Brucella melitensis*. *Am J Vet Res* 2018; 78: p. 495–499.
- 70) Shemesh AA, Yagupsky P. 2011. Limitations of the standard agglutination test for detecting patients with *Brucella melitensis* bacteremia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11: p. 1599–1601.
- 71) Eldin C, Parola P, Raoult D. Limitations of diagnostic tests for bacterial infections. *Med Mal Infect* 2019; 49(2): p. 98-101.
- 72) Yang X, Skyberg JA, Cao L, Clapp B, Thornburg T, Pascual DW. Progress in *Brucella* vaccine development. *Front Biol* 2013; 8(1): p. 60–77.
- 73) Ranjbar M. Treatment of brucellosis, In: Baddour M. (ed.), *Updates on Brucellosis*. InTech Teheran 2015; p. 171-184.
- 74) Solis J, Del Pozo G, Solera J. 2015. Treatment of human brucellosis-review of evidence from clinical trials. In: Baddour M. (ed), *Updates on Brucellosis*. InTech Villarrobledo Albacete. 2015; p. 186-189.

- 75) Skalsky K, Yahav D, Bishara J, Pitlik S, Leibovici L, Paul M. Treatment of human brucellosis: systematic review and metaanalysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 2008; 336(7646): p. 701-704.
- 76) Alavi SM, Alavi L. Treatment of brucellosis: a systematic review of studies in recent twenty years. *Caspian. J. Intern. Med* 2013; 4(2): p. 636–641.
- 77) Smith JA, Khan M, Magnani DD, Harms JS, Durward M, Radhakrishnan GK. Brucella induces an unfolded protein response via TcpB that supports intracellular replication in macrophages. *PLoS Path* 2013; 9(12): URL: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003785>
- 78) Arayan ST, Simborio HL, Reyes AW, Hop HT, Min W, Lee HJ. The effects of red ginseng saponin fraction-A (RGSF-A) on phagocytosis and intracellular signaling in *Brucella abortus* infected RAW 264.7 cells. *FEMS Microbiol. Lett* 2015; 362(11).
[URL:https://academic.oup.com/femsle/article/362/11/fnv070/490141](https://academic.oup.com/femsle/article/362/11/fnv070/490141)
- 79) Huy TX, Reyes AW, Hop HT, Arayan LT, Min W, Lee HJ. 2017. Intracellular trafficking modulation by ginsenoside Rg3 Inhibits *Brucella abortus* uptake and intracellular survival within RAW 264.7 cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 27(3): p. 616–623.
- 80) Naghadi N, Assanzad-Azar H, Delpisheh A. The most important medicinal plants for treatment of brucellosis. *J. Prev. Epi.* 2016; 1(2): p. 20-45.
- 81) Öncel S. Brusella enfeksiyonları: değerlendirme ve yönetim. *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi Eylül* 2016; 2(3): s.25-30.
- 82) Şahin M, Cesur S, Enki S. Endemik olduğu bir bölgeden 83 olgu ile brusella enfeksiyonu. *Ortadoğu Tıp Dergisi* 2019; 11(2): s. 101-106.
- 83) Turfan N. Brusella Enfeksiyonunun Kalbin İleti Sistemi Üzerine Olan Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Tıpta Uzmanlık, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı.* Van 2018. s. 1-43.
- 84) Giannacopoulos I, Eliopoulou MI, Ziambaras T, Papanastasion DA. (2002). Transplacentally Transmitted Congenital Brucellosis Due to *Brucella abortus*. *Journal of Infection* 2002; 45(3) p. 209-210.
- 85) Lim ML, Rickman LS. Brucellosis. *Infectious Diseases in Clinical Practice* 2004; 12(1):p. 7–14

- 86) Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Veterinary Microbiology* 2010; 140(3-4): p. 392-398.
- 87) Zhang X, Yu Y, Lei H, Cai Yu, Shen J, Zhu P et al. The Nrf-2/HO-1 Signaling Axis: A Ray of Hope in Cardiovascular Diseases. *Cardiology Research and Practice* 2020. Jan 30 2020; URL: <https://www.hindawi.com/journals/crp/2020/5695723/>
- 88) Heiss EH, Schachner D, Zimmermann K et al. Glucose availability is a decisive factor for NRF2-mediated gene expression. *Redox Biology* 2013;1(1): p. 359–365.
- 89) Suryakant KN, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of NRF2—an update. *Free Radical Biology and Medicine* 2014; 66(8). p. 36-44.
- 90) Chandran R, Kim T, Mehta SL, Udho E, Chanana V, Cengiz P, Kim H, Kim C, Vemuganti R. A combination antioxidant therapy to inhibit NOX2 and activate NRF2 decreases secondary brain damage and improves functional recovery after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018;38: p. 1818–1827.
- 91) Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. NRF2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018;1865: p. 721–733.
- 92) Biswas C, Shah N, Muthu M, La P, Fernando AP, Sengupta S, Yang G, Dennery PA. Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of NRF2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses. *J Biol Chem.* 2014;289: p.26882–26894
- 93) Reddy NM, Potteti HR, Vegiraju S, Chen HJ, Tamatam CM, Reddy SP. PI3K-AKT signaling via NRF2 protects against hyperoxia-induced acute lung injury, but promotes inflammation post-injury independent of NRF2 in mice. *PLoS ONE.* 2015;10(6): p. 47-51.
- 94) Calkins MJ, Johnson DA, Townsend JA, Vargas MR, Dowell JA, Williamson TP, et al. The NRF2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(3): p. 497–508.
- 95) Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of Mitochondrial Transcription Specificity Factors (TFB1M and TFB2M) by Nuclear Respiratory Factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1

- FamilyCoactivators. AmericanSocietyforMicrobiologyMolecularand Cellular Biology, 15 February 2005; 25(4): p. 354-366
- 96) Michalak L, Bulska M, Strzabala K, Szczesniak P. Postepy Hig Med Dosw Neopterin as a marker of cellular immunological response. 2017 Aug 24;71(1): p. 727-736.
- 97) Giesege SP, Maghzal G, Glubb D. (2000) Inhibition of haemolysis by the macrophage synthesized antioxidant, 7,8-dihydroneopterin, Redox Report 2000; 5:p. 97–100.
- 98) Lindsay A, Petersen C, Blackwell G, Ferguson H, Parker G, Steyn N. et al. The effect of 1 week of repeated ischaemic leg preconditioning on simulated Keirin cycling performance: a randomised trial. *BMJ Open Sport & Exercise Medicine* 2017; 3: URL: <https://bmjopensem.bmj.com/content/3/1/e000229>
- 99) Lindsay A, Baxter-Parker G, Giesege SP. Pterins as Diagnostic Markers of Mechanical and Impact-Induced Trauma: A Systematic Review. *J Clin Med.* 2019; 8(9):p. 1383.
- 100) Flavall EA, Crone EM, Moore GA, Giesege SP. (2008) Dissociation of neopterin and 7, 8-dihydroneopterin from plasma components before HPLC analysis *Journal of Chromatography* 2008; 863(1):p. 167–171.
- 101) Lindsay A, Giesege SP. (2020) Pterins as diagnostic markers of exercise-induced stress: a systematic review. *Journal of Science and Medicine in Sport* 2020;23:p. 53–62.
- 102) Baxter-Parker G, Roffe L, Cross S, Frampton C, Hooper GJ, Giesege SP. Knee replacement surgery significantly elevates the urinary inflammatory biomarkers neopterin and 7,8-dihydroneopterin, *Clinical Biochemistry* 2019; 63:p. 39–45.
- 103) Waza AA, Hamid Z, Ali S, Bhat SA, Bhat MA. [A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil. Inflammation Research 24 April 2018;67\(7\): p. 579-588.](#)
- 104) Nitti M, Piras S, Marinari UM, Moretta L, Pronzato MA, Furfaro AL. HO-1 induction in cancer progression: a matter of cell adaptation. *Antioxidants.* 2017;6: p.29.

- 105) Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, Noguchi M. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 2004;336(2): p. 241–250.
- 106) Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006;86: p. 583–650.
- 107) Son Y, Lee JH, Chung HT, Pae HO. Therapeutic roles of heme oxygenase-1 in metabolic diseases: curcumin and resveratrol analogues as possible inducers of heme oxygenase-1. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013: URL: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/639541/>
- 108) Lee PJ, Alam J, Sylvester SL, Inamdar N, Otterbein L, Choi AM. Regulation of heme oxygenase-1 expression in vivo and in vitro in hyperoxic lung injury. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology* 1996; 14(6):p. 556-568.
- 109) Kitamuro T, Takahashi K, Ogawa K, Uono-Fujimori R, Takeda K, Furuyama K, et al. Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278(1): p. 9125–9133.
- 110) Haines DD, Tosaki A. Heme degradation in pathophysiology of and countermeasures to inflammation-associated disease. *Int. J. Mol. Sci. Dec.* 2020;21(24):p. 9698.
- 111) Donegan RK, Moore CM, Hanna DA, Reddi AR. Handling heme: The mechanisms underlying the movement of heme within and between cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2019;133: p. 88–100.
- 112) Kumar A, Ganini D, Deterding LJ, Ehrenshaft M, Chatterjee S, Mason RP. Immuno-spin trapping of heme-induced protein radicals: Implications for heme oxygenase-1 induction and heme degradation. *Free Radic. Biol. Med.* 2013;61: p. 265–272.
- 113) Ferrandiz ML, Devesa I. Inducers of heme oxygenase-1. *Curr. Pharm. Des.* 2008; 14:p. 473–486
- 114) Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010; 50:p. 323–354.

- 115) Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 37:p. 1097–1104
- 116) Soares MP, Bach FH. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol. Med.* 2009; 15:p. 50–58
- 117) Centers for Disease Control and Prevention. Brucellosis - Humans and Brucella Species [Internet]. Brucellosis Homepage. 2012. <http://www.cdc.gov/brucellosis/clinicians/brucella-species.html>
- 118) Çevik MA. Bruselloz Epidemiyolojisi, *Ankem Dergisi* 2001; 15(3): s. 568-570.
- 119) Guidarelli A, Fiorani M, Cerioni L, et al. Calcium signals between the ryanodine receptor- and mitochondria critically regulate the effects of arsenite on mitochondrial superoxide formation and on the ensuing survival vs apoptotic signaling. *Redox Biology* 2019;20: p. 285–295.
- 120) Li S, Jiang X, Luo Y, et al. Sodium/calcium overload and Sirt1/NRF2/OH-1 pathway are critical events in mercuric chloride-induced nephrotoxicity. *Chemosphere* 2019;234: p. 579–588.
- 121) Kerins MJ, Ooi A. The roles of NRF2 in modulating cellular iron homeostasis. *Antioxidants & Redox Signaling* 2018;29(17): p. 1756–1773.
- 122) Song F, Kong F, Zhang H, et al. Ulinastatin protects against CVB3-induced acute viral myocarditis through NRF2 activation. *Inflammation* 2018;41(3): p. 803–810.
- 123) Ai F, Zheng J, Zhang Y, et al. Inhibition of 12/15-LO ameliorates CVB3-induced myocarditis by activating NRF2. *Chemico-Biological Interactions.* 2017;272: p. 65–71.
- 124) Wang T, Jian Z, Xiao A, et al. Melittin ameliorates CVB3-induced myocarditis via activation of the HDAC2-mediated GSK-3 β /NRF2/ARE signaling pathway. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 2016;480(1): p. 126–131.
- 125) Zhang M, Zhu J, Qin X, et al. Cardioprotection of tetrahedral DNA nanostructures in myocardial ischemia-reperfusion injury. *ACS Applied Materials and Interfaces* 2019;11(34): p. 30631–30639.

- 126) Dong J, Feng X, Zhang J, et al. omega-3 fish oil fat emulsion preconditioning mitigates myocardial oxidative damage in rats through aldehydes stress. *Biomedicine Pharmacotherapy* 2019;118: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332219314532?via%3Dihub>
- 127) Enayati A, Yassa N, Mazaheri Z, et al. Cardioprotective and anti-apoptotic effects of *Potentilla reptans* L. root via NRF2 pathway in an isolated rat heart ischemia/reperfusion model. *Life Sciences* 2018;215: p. 216–226.
- 128) He F, Antonucci L, Karin M. NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer, *Carcinogenesis* 2020;14(1): p. 405-416.
- 129) Chauvin M, Larsen M, Quirant B, Quentric P, Dorgham K, Royer L, et al. Elevated Neopterin Levels Predict Fatal Outcome in SARS-CoV-2-Infected Patients. *Frontiers of Cellular and Infections Microbiology*. 2021; 11: p. 764.
- 130) Neopterin and Soluble CD14 Levels as Indicators of Immune Activation in Cases with Indeterminate Pattern and True Positive HIV-1 Infection. *PLoS One*. 2016; 11(3): URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4816292/>
- 131) Robertson J, Gostner JM, Nilsson S, Andersson LM, Fuchs D, Gisslen M. Serum neopterin levels in relation to mild and severe COVID-19. *BMC Infectious Diseases* 2020; 20(1): p. 1-6.
- 132) Amirayan-Chevillard N, Tissot-Dupont H, Obadia Y, Gallais H, Mege JL, Capo C. Highly active antiretroviral therapy (HAART) and circulating markers of immune activation: specific effect of HAART on neopterin. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000; 7: p. 832–834.
- 133) Eisenhut M. Neopterin in diagnosis and monitoring of infectious diseases. *J Biomark* 2013; 2013: URL: <https://www.hindawi.com/journals/jbm/2013/196432/>
- 134) Immanuel C, Victor L, Chelvi KS, Padmapriyadarsini C, Rehman F, Iliayas S, et al. Serum neopterin levels in HIV infected patients with & without tuberculosis. *Indian J Med Res*. 2005; 121: p. 220–225.
- 135) Mildvan D, Spritzler J, Grossberg SE, Fahey JL, Johnston DM, Schock BR, et al. Serum neopterin, an immune activation marker, independently

- predicts disease progression in advanced HIV-1 infection. *Clin Infect Dis.* 2005; 40: p. 853–858.
- 136) Bipath P, Levay P, Olorunju S, Viljoen M. A non-specific biomarker of disease activity in HIV/AIDS patients from resource-limited environments. *Afr Health Sci.* 2015; 15: p. 334–343.
- 137) Eisenhut M, Hargreaves DS, Scott A, Housley D, Walters A, Mulla R. Determination of urinary Neopterin/creatinine ratio to distinguish active tuberculosis from latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Biomarkers* 2016;2016: p. 1–6.
- 138) Sun Y, He J, Tian J, Xie Z, Wang C, Yu B: Association of circulating levels of neopterin with non-culprit plaque vulnerability in CAD patients an angiogram, optical coherent tomography and intravascular ultrasound study. *Atherosclerosis* 2015; 241: p. 138-142
- 139) Kaski JC, Consuegra-Sanchez L, Fernandez-Berges DJ, Cruz-Fernandez JM, Garcia-Moll X, Marrugat J, Mostaza J, Toro-Cebada R, González-Juanatey JR, Guzmán-Martínez G: Elevated serum neopterin levels and adverse cardiac events at 6 months follow-up in Mediterranean patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Atherosclerosis* 2008; 201: p. 176-183.
- 140) Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of NRF2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(17): p. 3221-3247.
- 141) Fernandez-Mendivil C, Luengo E, Trigo-Alonso P, Garcia-Magro N, Negredo P, Lopez MG. Protective role of microglial HO-1 blockade in aging: Implication of iron metabolism. *Redox Biology* 2021; 38: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231720309940?via%3DiHub>
- 142) Salerno L, Romeo G, Modica MN, Amata E, Sorrenti V, Barbagallo I, Pittala V. Heme oxygenase-1: A new druggable target in the management of chronic and acute myeloid leukemia. *Eur. J. Med. Chem.* 2017;142: p. 163–178.

- 143) Bekeschus S, Freund E, Wende K, Gandhirajan RK, Schmidt A. Hmox1 upregulation is a mutual marker in human tumor cells exposed to physical plasma-derived oxidants. *Antioxidants*. 2018;7(11): p. 151.
- 144) Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HO-1/CO system in tumor growth, angiogenesis and metabolism—Targeting HO-1 as an anti-tumor therapy. *Vascular Pharmacology* 2015;74: p. 11–22.
- 145) Hassannia B, Wiernicki B, Ingold I, Qu F, Van Herck S, Tyurina YY, Bayır H, Abhari BA, Angeli JPF, Choi SM, et al. Nano-targeted induction of dual ferroptotic mechanisms eradicates high-risk neuroblastoma. *J. Clin. Investig.* 2018;128: p. 3341–3355.
- 146) Na HK, Surh YJ. Oncogenic potential of NRF2 and its principal target protein heme oxygenase-1. *Free Radic. Biol. Med.* 2014;67: p. 353–365.
- 147) HU H, Tian M, Yi Y, Zuo D, Guan X, Ding C. Brucella induces heme oxygenase-1 expression to promote its infection 2021 Dec 17. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.14422>