



**AKUT BRUSELLOZDA BAZI İNFLAMAZOM
GENLERİNİN İFADE EDİLME DÜZEYİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Gamze KARACA

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Başak KAYHAN
Yüksek Lisans Tezi – 2016**

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

**AKUT BRUSELLOZDA BAZI İNFLAMAZOM GENLERİNİN İFADE
EDİLME DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gamze KARACA

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Başak KAYHAN**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından 2013/77 Proje Numarası ile Desteklenmiştir.

MALATYA

2016

İnönü Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Gamze KARACA'nın "Akut Brusellozda Bazı İnflamazom Genlerinin İfade Edilme Düzeyinin Araştırılması"** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03/06/2016

Prof. Dr. Elif YEŞİLADA
İnönü Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Başak KAYHAN
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye

Doç. Dr. Ebru ETHEM ÖNALAN
Fırat Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2016 tarih ve 2016/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Bakteriyolojik Özellikler	4
2.2.1. Morfolojik Özellikleri	5
2.2.2. Antijenik Yapıları	5
2.2.3. Kültür Özellikleri	5
2.2.4. Virülans ve Patojenite Özellikleri	6
2.3. İnsanlarda Görülen Klinik Bulgular	7
2.4. Bruselloz Kliniği.....	8
2.5. Laboratuvar Tanısı	9
2.5.1. Bakteriyolojik Tanı	9
2.5.2. Serolojik Tanı.....	9
2.6. İmmün Yanıt	10
2.6.1. Doğal İmmün Yanıt	10
2.6.2. Kazanılmış İmmün Yanıt	11
2.7. <i>Brucella</i> ve Konak İmmün Sistemi Arasındaki İlişki	12
2.8. Doğal İmmün Yanıtta İnflamazomların Önemi	12
2.9. İnflamazom	13
2.9.1. AIM2 İnflamazom	13

2.9.1.1. İnflamasyon Esnasında AIM2'nin Fonksiyonu	14
2.9.2. NLRP3 İnflamazom	14
2.9.2.1. İnflamasyon Esnasında NLRP3'ün Fonksiyonu	15
2.9.3. NLRC4 İnflamazom.....	17
2.9.3.1. İnflamasyon Esnasında NLRC4'ün Fonksiyonu	18
2.9.4. CASPASE-1.....	19
2.10. Piroptozis ve CASPASE-1.....	20
2.11. İnflamasyon esnasında CASPASE-1	20
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	21
3.2. Kullanılan Kimyasallar	22
3.3. Hasta Tanımı ve Sayısı	23
3.4. Araştırmaya Dahil Olma Kriterleri	23
3.5. Araştırmadan Çıkarılma Kriterleri.....	23
3.6. Dokuların Alınması ve Örneklerin Analizi.....	24
3.7. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar	24
3.7.1. 5X Tris-Borat-EDTA (TBE) Çözeltisinin Hazırlanması	24
3.8. Toplam RNA Saflaştırılması (QIAamp RNA Blood Mini Kit Protokolü).....	24
3.9. RNA'nın Agaroz Jele Yükleme İşlemleri.....	25
3.10. cDNA Sentez Protokolü.....	25
3.11. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü	25
3.12. İstatistiksel analizler	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. Moleküler Genetik Bulgular	27
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	41

EKLER.....	49
EK-1: ÖZGEÇMİŞ	49
EK-2: ETİK KURUL KARARI	50
EK-3: HASTA BİLGİLENDİRME FORMU.....	52



TEŐEKKÜR

Yüksek lisans tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teőekkür ederim.



ÖZET

Akut Brusellozda Bazı İnflamazom Genlerinin İfade Edilme Düzeyinin Araştırılması

Amaç: Bruselloz, evcil ve yabani hayvanlarda *Brucella* cinsi bakteriler tarafından oluşturulan zoonotik bir hastalıktır. Akut brusellozda doğal immün yanıtın etkin bir şekilde aktive olmasıyla ilgili bilinenler çok azdır. Projemizde bu soruya yanıt bulabilmek amacıyla doğal immün yanıtın düzenlenmesinde rolü olan inflamazomların akut bruselloz sırasında ifade edilme düzeyleri araştırılmıştır.

Materyal ve metot: Bu çalışma yaşları 18-65 yaş aralığında değişen, herhangi bir alt hastalığı olmayan gönüllü 19 akut bruselloz hastası ile 19 sağlıklı bireyde gerçekleştirilmiştir. Periferal kandan izole edilen RNA kullanılarak cDNA sentezlendi ve ardından gerçek zamanlı PZR ile *AIM2*, *NLRP3*, *NLRC4* ve *CASPASE-1* genlerinin ifade düzeyleri ölçülmüştür.

Bulgular: Akut bruselloz hastalarında *AIM2* ve *NLRC4* inflamazom genlerinin ifadeleri anlamlı bir şekilde artarken ($p<0,05$); *NLRP3* ve *CASPASE-1* gen ifadelerinde ise hasta ve sağlıklı bireyler arasında istatistiksel anlamda bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Sonuç: Akut bruselloz hastalarında doğal immün yanıt gelişiminde rol alan *AIM2* ve *NLRC4* genlerinin ifadesinde artış saptanmıştır. *NLRP3* ve piroptozisten sorumlu *CASPASE-1* gen ifadeleri akut bruselloz sırasında anlamlı bir değişiklik göstermemektedir.

Anahtar Kelimeler: Akut bruselloz, *AIM2*, doğal immün yanıt, *CASPASE-1*, *NLRC4*, *NLRP3*

ABSTRACT

Investigation of Expression Level of some inflammasome Genes in Acute Brucellosis

Aim: Brucellosis is a zoonotic disease caused by *Brucella* in domestic and wild animals. The innate immune responses associated with acute brucellosis effectively be activated is very little known. Our research has examined the level of expression during the acute brucellosis of inflammasome role in regulating natural immune response in order to find the answer to this question.

Material and Method: In this study, the age range of 18-65 years of age, was conducted in 19 healthy volunteers and 19 volunteers acute brucellosis without any disease patients. cDNA is synthesized using RNA isolated from peripheral blood and then expression levels of *AIM2*, *NLRP3*, *NLRC4* ve *CASPASE-1* gene was measured.

Results: In patients with acute brucellosis, *NLRC4* and *AIM2* inflammasome of gene expression significantly increased ($p < 0.05$); *NLRP3* and *CASPASE-1* gene expression in patients and in healthy subjects, there was no statistically significant difference ($p > 0.05$).

Conclusion: *AIM2* and *NLRC4* inflammasome of gene expression that involved in the innate immune response development significantly increased in patients with acute brucellosis. *NLRP3* and pyroptosis responsible *CASPASE-1* gene expression does not change during acute brucellosis.

Key Words: Acute brucellosis, *AIM2*, *CASPASE-1*, innate immune response, *NLRC4*, *NLRP3*

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µL	: Mikrolitre
AIM2	: Absent in melanoma 2 geni
ALR	: Absent in melanoma 2 (AIM2)-benzeri reseptörler
ASC	: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
BCV	: <i>Brucella</i> içeren vakuol (<i>Brucella</i> -containing vacuole)
CARD	: CASPASE aktive edici ve gerektirici domaini (Caspase Recruitment Domain)
CASPASE	: Kaspaz (Cystein dependent Aspartate Spesifik Proteinase)
CASPASE-1	: Kaspaz-1 (Cystein dependent Aspartate Spesifik Proteinase-1)
CLR	: C-tipi lektin reseptörleri (C-Type Lectin Receptors)
DAMP	: Konak kaynaklı tehlike sinyalleri (Danger Associated Molecular Patterns)
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
GAPDH	: Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz
HIN200	: 200 aminoasit tekrarlı hemapoiyetik interferon indükleyici nüklear proteinler (Hematopoietic interferon-inducible nuclear proteins with 200 amino-acid repeat)
IFI16	: İnterferon-indükleyici protein 16 (Interferon-inducible protein 16)
TYPE-1 IFN	: Tip I interferon
IgG	: İmmüoglobulin-G
IgM	: İmmüoglobulin-M
LPS	: Lipopolisakkarit
LRR	: Lösince zengin tekrarlar (Leucine Rich Repeat)
NACHT	: Nükleotid bağlayan oligomerizasyon domaini (Nucleotide-binding and oligomerization domain)
NBD	: Nükleotid bağlayan domain (Nucleotide-Binding Domain)
NLR	: NOD-benzeri reseptörler (Nod Like Receptor)

NLRC4	: NOD-like receptor family, Caspase Recruitment Domain-Containing 4
NLRP3	: NOD-like receptor family pyrin domain containing 3
OMP	: Dış membran proteinlerini (Outer Membrane Protein)
PAMP	: Patojenle ilişkili moleküler örgüler (Pathogen Associated Molecular Patterns)
PGN	: Peptidoglikan
PRR	: Örgü tanıyan reseptörler (Pattern Recognition Receptors)
PYD	: Pyrin domaini
PYHIN	: Pyrin ve HIN200 domaini
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RLR	: Retinoik asit-indükleyen protein 1 (RIG-1)-benzeri reseptörler (RIG-I-Like Receptors)
S-LPS	: Smooth-Lipopolisakkarit
T3SS	: Tip III sekresyon sisteminin
T4SS	: Tip IV sekresyon sistemi
TBE	: Tris-Borat-EDTA
TLR	: Toll-benzeri reseptörler (Toll Like Receptor)
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör- α (Tumor Necrosis Factor)
VirB	: VirB operonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1.	AIM2 inflamazom ve çift zincirli DNA ile beraber temsili görüntüsü ... 14
Şekil 2.2.	NLRP3 inflamazom yapısı 15
Şekil 2.3.	NLRP3 İnflamazomunun aktivasyonu 17
Şekil 2.4.	NLRC4 inflamazomunun yapısı..... 18
Şekil 2.5.	İnflamazomların etki mekanizması 19
Şekil 4.1.	Sağlıklı kontrol grubuna ait bir periferik kan örneğinden RNA izolasyonu sonrası cDNA eldesi ve real time PZR sonunda PZR ürünü DNA örneklerinin jel elektroforezinde yürütülmesi..... 28
Şekil 4.2.	mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltımı sırasındaki oluşan çoğaltım eğrileri 28
Şekil 4.3.	AIM2 geninin erime noktası grafiği..... 29
Şekil 4.4.	NLRP3 geninin erime noktası grafiği..... 29
Şekil 4.5.	CASPASE-1 geninin erime noktası grafiği..... 29
Şekil 4.6.	NLRC4 geninin erime noktası grafiği..... 30
Şekil 4.7.	GAPDH geninin erime noktası grafiği 30
Şekil 4.8.	Hasta ve kontrol grubundaki AIM2 gen ifadelerinin karşılaştırılması 32
Şekil 4.9.	Hasta ve kontrol grubundaki NLRC4 gen ifadelerinin karşılaştırılması.. 32
Şekil 4.10.	Hasta ve kontrol grubundaki NLRP3 gen ifadelerinin karşılaştırılması.. 33
Şekil 4.11.	Hasta ve kontrol grubundaki CASPASE-1 gen ifadelerinin karşılaştırılması 33
Şekil 4.12.	AIM2, NLRC4, NLRP3 ve CASPASE-1 genlerinin kat değişim grafiği .. 34

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa No
Tablo 3.1.	Primer özellikleri	26
Tablo 4.1.	RNA ölçüm sonuçları	27
Tablo 4.2.	Referans gen olan GAPDH için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri	31



1. GİRİŞ

Bruselloz, evcil ve yabani hayvanlarda *Brucella* cinsi bakteriler tarafından oluşturulan zoonotik bir hastalıktır. *Brucella* cinsi bakteriler genellikle sığır, koyun, keçi, domuz, köpek gibi hayvanların özellikle testis, meme, uterus gibi genital organlarına yerleşerek enfeksiyon oluştururlar. Oluşan bu enfeksiyon sonucu hayvanlarda yavru atma, kısırlık ve süt veriminin azalması gibi patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır (1).

Hastalık insanlara pastörize edilmemiş süt ürünleri, enfekte hayvanlarla direkt temas veya enfekte aerosollerini soluma yoluyla bulaşmaktadır. Bruselloz klinik olarak akut, subakut, kronik ve relaps olmak üzere dört farklı şekilde seyir gösterebilir. Hastalığın morbiditesi oldukça yüksek olup bu durum hayvanlarda önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (2).

Brucella türleri makrofajlar içerisinde yaşayan fakültatif hücre içi bakterilerdir. Bu bakteriler Retikuloendotelial sistem hücrelerini enfekte ederler ve replikasyonları endoplazmik retikulumda gerçekleşir. *Brucella* türleri hem fagositik hem de fagositik olmayan hücreleri enfekte etmektedir. *Brucella* pek çok özelliği ile diğer bakterilerden farklılık göstermektedir. Öncelikle ekzotoksin veya endotoksin gibi klasik virulans faktörleri yoktur ve lipopolisakkaritlerinin patojenitesi farklıdır. Diğer yandan nötrofiller tarafından öldürülmeye dirençlidir ve programlanmış hücre ölümünü inhibe ederek makrofajlar ve fagositler içerisinde replike olurlar (3).

İmmün yanıt doğal ve kazanılmış immün yanıt olmak üzere iki tiptir ve her iki immün yanıtta birbiri ile bağlantılıdır. Doğal immün yanıtın yeterli düzeyde aktive olamaması, kazanılmış immün yanıtın bir parçası olan hücreli immün yanıtın da yeterli düzeyde gelişmemesine neden olmaktadır. Buna göre; bruselloz esnasında yetersiz doğal immün yanıt gelişimi hücreli immün yanıtın şiddetini de etkileyebilir (4). Doğal immün yanıtın etkin düzeyde aktivasyonunda inflamazomlar önemli rol oynamaktadır. İnflamazomlar, pro-inflamatuvar sitokinler olan interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-18'in (IL-18) üretimini uyarabildiği gibi CASPASE-1 aktivasyonuna bağlı olarak piroptozis hücre ölümüne neden olabilen çok sayıda protein yapıdaki moleküllerdir (4). CASPASE-1 aktivasyonu sonrası piroptozise neden olan inflamazomlar Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain (ASC)

proteini içeren NOD-like receptor family, Caspase Recruitment Domain-Containing 4 (NLRC4), Absent in melanoma (AIM2) ve NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflamazomlarıdır. Bu inflamazomların fonksiyonu ile gelişen CASPASE-1 aktivasyonu piroptozise neden olarak bakteri kaynaklı enfeksiyonda immün yanıtın gelişimini engelleyebildiği gibi aynı zamanda inflamasyonun düzenlenmesine de neden olmaktadır (4-6).

Bruselloz antibiyotik tedavisi sonrası iyileşme gösteren bir hastalık olmasına karşın; tedavi sonrası hastaların bir kısmında enfeksiyon tekrar gelişebilmektedir. Bu noktada akut bruselloz esnasında doğal immün yanıtın etkin düzeyde aktive olup olmadığı merak konusudur. Araştırmamız bu soruya yanıt bulabilmeyi amaçlanmıştır ve inflamatuvar immün yanıtın aşağı yönde düzenlenmesinde rolü olan inflamazomların akut bruselloz sırasında ifade edilme düzeyleri araştırılmıştır. Bu amaçla *NLRC4*, *AIM2* ve *NLRP3* genleri ve piroptozis oluşumuna yön veren *CASPASE-1* ifade edilme düzeyleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Brusellozis *Brucella* cinsi bakteriler tarafından oluşturulan ve temel olarak hayvanlarda görülen bir hastalıktır. Bruselloz, hasta hayvanlardan elde edilen enfekte olmuş et, süt, ve süt ürünlerinin tüketilmesiyle ya da hayvanın idrar, vücut sıvıları ve gebelik materyali aracılığıyla insanlara bulaşan bir hastalıktır. Bruselloz keçi, koyun, sığır, manda ve domuz gibi ekonomik değeri olan hayvanların ölümlerine, süt ve et veriminin düşmesine neden olmasının yanı sıra uzun süren tedavi sürecinden dolayı iş gücü kaybına da neden olmaktadır (7). Bu nedenle *Brucella* ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca bu özelliklerinden dolayı *Brucella* biyo terörizm ajanı olarak kabul edilmiştir (8, 9).

Brusellozis; Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi tarafından dünyada en yaygın zoonotik hastalık olarak kabul edilmiştir (10).

DSÖ verilerine göre; dünyada her yıl 500.000 yeni olgu saptanmaktadır. Orta Doğu, Asya'nın batısı, Akdeniz ülkeleri, Afrika ve Latin Amerika'nın bir bölümünde endemik seyir göstermektedir. Türkiye'de bu endemik bölgelerin içinde yer almaktadır. Norveç, Belçika, Hollanda, Finlandiya, Yeni Zelanda, Kanada, İngiltere ve Avustralya gibi bazı ülkelerde hastalık eradike edilmiştir (11).

2.1.Tarihçe

Volkanik patlamalar sonucu harap olan eski bir Roma şehrinin kalıntılarında bulunan bir erişkin iskeletinde; brusellozun tipik kemik lezyonlarına raslanmıştır. Ayrıca bulunan karbonize peynirlerin elektron mikroskopuyla yapılan analizlerinde *Brucella spp*'ye morfolojik olarak benzeyen kok benzeri formların varlığı tespit edilmiştir (12).

Bruselloza benzeyen klinik vakalar ilk olarak M.Ö. 450 yıllarında Hipokrat tarafından tanımlanmıştır ve humma olarak adlandırılmıştır. Ancak Brusellozun ilk tanımı 1860 yılında bir cerrah olan Marston tarafından yapılmıştır (13).

Bruselloz etkeni ilk kez 1887 yılında Sir David Bruce tarafından izole edilmiştir ve *Micrococcus melitensis* olarak adlandırmıştır (13). Danimarkalı veteriner Bang, 1895 yılında sığırlardan düşük etkeni olarak *Bacillus abortus*'u izole etmiştir. 1905 yılında

Maltalı bir doktor olan Zammit, hastalığın rezervuarının keçiler olduğunu ve hastalığın insanlara taze keçi sütünden bulaştığını belirtmiştir (14).

1918 yılında Amerikalı bir bakteriyolog olan Alice Evans, Malta Ateşi ve Bang hastalığının etkenlerinin birbiriyle yüksek derecede benzer olduğunu göstermiştir. Kısa bir süre sonra bu iki türün morfolojik, kültür ve biyokimyasal özellikleri kıyaslanarak yapılan incelemelerinde bunların aynı cins içinde oldukları belirtilmiş ve Sir David Bruce'un anısına *Brucella* cinsi olarak adlandırılmıştır (1).

1914'de Traum; domuz düşük materyalinde *B.suis*'i, 1966'da Carmichael köpeklerden *B.canis*'i izole etmişlerdir (14). *B.ovis* 1953'de koyunlardan, *B. neotomae* ise 1957'de sığırcılardan izole edilmiştir ve günümüze kadar bu iki türün insanlarda hastalık yaptığı gösterilememiştir (13). 1994'te deniz memelilerinden *Brucella maris* olarak adlandırılan bir tür izole edilmiştir (14).

Brusellozun tarihsel isimleri, "Ondülan ateş", "Bang hastalığı", "Gibraltar hastalığı", "Akdeniz ateşi" ve "Malta ateşi" olarak da bilinmektedir (10).

Ülkemizde ise, *B.melitensis* ilk defa 1915 yılında Kuleli hastanesinde bir askerde tespit edilmiştir (15). Hastalık ilk olarak Malta adasında saptandığından "Malta Humması" veya "Akdeniz Humması" olarak isimlendirilmiştir. Hastalığa, klinik görünümündeki yükselip alçalan ateş nedeni ile "dalgalı humma" denmiştir. Ülkemizde bu hastalık; *B.melitensis*'in koyunlardan insanlara bulaşması nedeniyle "koyun hastalığı", hastalığın hayvanlardan insanlara bulaşması nedeniyle de "mal hastalığı" gibi isimlerle de anılmaktadır (16).

2.2. Bakteriyolojik Özellikler

Brucella bakterisi α 2-Proteobacteriaceae ailesinin bir üyesidir (17). *Brucella* türleri zorunlu aerop bakteriler olup oksidatif tipte metabolizmaya sahiptir (18). *Brucella* türleri arasında %94'ten fazla benzerlik görülmesine rağmen farklı konaklar tercih etmektedirler (19).

Brucella bakterisinin yedi türü bulunmaktadır. Bunlar; *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*, *B.canis*, *B.ovis* ve *B.neotomae* ve *B. maris*'tir. Bunlardan *B.melitensis*, *B.suis* ve *B.abortus* insanlar için patojen olan türlerdir (20).

2.2.1. Morfolojik Özellikleri

Brucella bakterileri gram negatif boyanan, kokoid, hareketsiz, sporsuz, çomak şeklinde bakterilerdir. Kapsüllü olan bazı suşları bulunmaktadır (21). *Brucella*'lar; 0,5–0,7µm eninde, 0,6–1,5µm boyunda hareketsiz, sporsuz kokobasillerdir. Kenarları hafif konveks ve uçları yuvarlaktır. Tek, çift, kısa zincir veya küçük kümeler halinde görülürler (22).

2.2.2. Antijenik Yapıları

Brucella cinsi mikroorganizmaların antijenik yapılarına, virulans mekanizmalarına ve koruyucu bağışıklıktaki rollerine ilişkin son 50 yılda çok sayıda araştırma yapılmıştır. Diğer birçok gram negatif bakterinin aksine *Brucella spp.*'nin hücre duvarında pilus, fimbria ve kapsül gibi kompleks yapılar bulunmaz. Ancak konak hücreyi enfekte etmeden önce dış yüzeyinde geçici flajellin yapısı bulundurur (23). Dış membran, virulans faktörler olarak tanımlanan lipopolisakkarit (LPS) ve dış membran proteinlerini (OMP) içermektedir (24).

“Smooth” *Brucella* LPS (S-LPS) yapısı, Enterobacteriaceae ailesindeki mikroorganizmaların LPS yapılarına benzer şekilde O-polisakkarit, kor bölgesi ve lipid A'dan oluşmaktadır. “Smooth” *Brucella* suşları, LPS tabakasında A ve M olarak adlandırılan antijenler taşımaktadır (25). *B.abortus* ve *B.suis*'te A antijeni fazla, M antijeni az; *B.melitensis*'de ise M antijeni fazla A antijeni az miktarlardadır. Bu miktarlar oran olarak ifade edildiğinde *B.abortus* ve *B.suis*'de A'nın M'ye oran 20/1 iken, *B.melitensis*'de bu oran 1/20 dir (26).

2.2.3. Kültür Özellikleri

Genellikle yavaş ve zor üreyen *Brucella*'ların besi yerlerinde üremeleri zordur. *Brucella* cinsi bakteriler, bir çok aminoasiti içeren kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyarlar. Üremeleri için tiamin, nikotinamid ve biyotinin ortamda bulunması esastır. Besi yerine kan ve serumun eklenmesi üremeleri üzerine olumlu etki yapar (26). *B.abortus* ve *B.ovis*, üremeleri için besiyerine %5-10 oranında katılmış seruma ihtiyaç gösterirler (27).

B.abortus'un bazı tipleri ve *B.ovis* üremek için %10 CO₂'ye ihtiyaç duyarlar. Bu bakteriler her ne kadar 20–40°C arasında üreyebilselerde optimum üreme sıcaklıkları 37°C'dir. Üremeleri için uygun pH ise 6.6-7.4 arasında olmalıdır. *Brucella* bakterilerinin üretilmeleri ve izolasyonları için genelde katı besiyerleri kullanılır. *Brucella spp.*'nin izolasyonunda bugüne kadar birçok besiyeri geliştirilmiştir. Organizmaların üretilmesinde en çok kullanılan temel besiyerleri serum-dekstroz agar, serum-triptoz agar ve serum-triptikaz agardır. Bu üç besiyeri selektif besiyerlerine temel teşkil ederler (26). Morgan; temel besiyerine %0.5 oranında katılan Tween-40'ın, *B.abortus* üretiminde serumun yerini alacağını bildirmiş ve basitrasın, polimiksin ve aktidion eklenen serum dekstroz agarın bütün *Brucella* türlerinin üremesini teşvik eden en ideal besiyeri olduğunu bildirmiştir (28).

Brucella'ların kontamine olmuş materyallerden izolasyonunda diğer mikroorganizmaların üremelerini inhibe etmek amacıyla temel besiyerlerine çeşitli antibiyotiklerin ve boyaların katılması ile birçok selektif besiyerleri geliştirilmiştir. Koloniler genellikle küçük, kabarık, S şekilli ve saydam renklidirler (26). Tüm *Brucella* türleri katalaz pozitifler ve eritrositleri parçalamazlar. Metil red negatifler ve sitratlı besiyerlerinde üreyemezler (29). *B.neotomae* dışında, besiyerlerinde karbonhidratlardan asit oluşturmazlar. *B.ovis*, *B.neotomae* ve *B.abortus*'un bazı suşları hariç tüm *Brucella* türleri oksidaz pozitifdir. *B.ovis* hariç diğer *Brucella* türleri nitratları indirgerler (26).

2.2.4. Virülans ve Patojenite Özellikleri

Brucella doğal immün sistem hücrelerinden kaçmak için bir takım stratejiler sergiler. Böylece konağa yeteri kadar bakteri girmesi sağlanır. *Brucella*'nın LPS molekülü lipid A, kor oligosakkarit ve O-antijeni içerir. Lipid A, enfeksiyonun erken aşamalarında konak immün sisteminden kaçış için önemlidir (30).

Brucella'nın patojenitesi tam olarak karakterize edilememiş ve klinik belirtilerinin altında yatan mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. Organizmanın hayatta kalma stratejisi monosit hücreleri içinde yaşam alanı oluşturmaya yöneliktir. *Brucella* LPS'si endotoksin etkinliğine sahiptir ve fagositoza dirençte anahtar rol oynar. LPS, fagozom-lizozom füzyonunu baskılar ve daha sonra hücre içi çoğalmanın yer aldığı endoplazmik retikulum içine yerleşen bakterileri yönlendirmede önemli rol oynar (31).

Brucella bakterisinin hücre içindeki yaşamını düzenleyen, *virB* operonu (VirB) tarafından kodlanan tip IV sekresyon sistemi (T4SS); bakterinin hayatta kalması için çok önemlidir. *Brucella* fagozom içinde hayatta kalımı kolaylaştıran aside dirençli proteinler üretmektedirler. Böylece reaktif oksijen kaynaklı ara maddelere karşı dirençlerini arttırabilirler. Virülan *Brucella* defensinlere dirençlidir ve reaktif oksijen ara maddelerine karşı dirençlerini arttıran bakır-çinko (Cu-Zn) süperoksit dismutaz üretirler (32).

Brucella fagosite edildikten sonra, konak sitozolünde efektör proteinlerin translokasyonuna yol açan tip IV sekresyon sistemi (T4SS) indüklenir. Böylece bakterinin lizozomla birleşmesi engellenir ve *Brucella* içeren vakuol (BCV) oluşumu sağlanır. BCV, endoplazmik retikulum ile etkileşim halinde olan replikasyon için önemli olan bir yapıdır (33).

2.3. İnsanlarda Görülen Klinik Bulgular

Bruselloz vücuttaki tüm organlarda enfeksiyon meydana getirebileceğinden hastalık çok çeşitli klinik tablolarla ortaya çıkabilmektedir. Klinik belirtiler özgül olmayıp; yüksek ateş, terleme, titreme, sırt ve eklem ağrıları, miyalji ve atralji gibi bulgularla kendini göstermektedir (34).

Brusellozun seyrine göre gastrointestinal sistem, iskelet sistemi, sinir sistemi veya kardiyovasküler sistem gibi çeşitli organ ve sistem tutulumları meydana gelebildiği görülmektedir. Bununla beraber ülkemizdeki olgu serileri klinik yönden incelendiğinde özellikle gastrointestinal sistem ve kas iskelet sistemi tutulumlarının ön plana çıktığı ifade edilmektedir (35).

Bruselloz bir retikulo-histiositer sistem hastalığıdır ve belli organ ve dokulara yerleşmektedir (36). *Brucella* vücuda girdikten sonra, lenfatik kanallar ve bölgesel lenf bezleri aracılığı ile ana lenf damarına oradan da kan dolaşımına katılır. Kandaki bakteriyemi sonucu kan yoluyla parankimal organlara taşınır. Lenf dokusu, karaciğer, dalak, kemik iliği ve retikuloendotelial sistemin diğer kısımlarında mikroorganizmaların neden olduğu granülatöz lezyonlar, abse formlarına dönüşebilir. *Brucella* bu lezyonlarda hücre içinde bulunur (37).

Brucella özellikle göğüs, gebe uterusu, lenf düğümlerinde, testislerde ve seyrek olarak da eklem ve tendon kılıflarına yerleşir (38). *Brucella*'nın yol açtığı endokardit

sonucu ölüm ortaya çıkabilir ve mortalite yaklaşık %5 civarındadır. *Brucella* kronik nörolojik hastalıklara da neden olabilir (39).

2.4. Bruselloz Kliniği

Hastalığın birbirinden farklı 4 klinik tablosu vardır.

Akut enfeksiyon: Hastalığın en tipik formudur. En sık rastlanan belirtiler; ateş, titreme, terleme, halsizlik, vücutta yaygın ağrılar ve iştahsızlıktır. Akşam saatlerinde üşüme ve titreme ile birlikte yüksek ateş belirtileri gözlenmeye başlar. Her gün biraz daha artarak 8-10 günde 39-40°C'ye ulaşır. Birkaç saat süren ateş sonunda sabaha doğru terlemeyle son bulur. Tedavi sürecine başlanmamış ise ateş her gün kademe kademe düşer. İki hafta sonunda ateş normal değerlere geriler. Hastada geçici bir iyileşme hali gözlenir. 8-10 gün sonra aynı belirtiler tekrar gözlenmeye başlar. Hastalık ateşli ateşsiz dönemler halinde sürer. Yetişkin hastaların %80'inde eklemlerde gezici ağrılar, bel ağrısı şikayetleri görülür. Ağrılar tedaviye başlanmazsa şiddetlenerek artar (40-42).

Subakut enfeksiyon: Semptomların başlamasından itibaren 8 haftaya kadar olan olgular akut, 8-52 hafta arası olgular subakut olarak kabul edilir. Grip ile benzer klinik tablo vardır. Subakut formda vakaların %90'ında ilk 6 ayda daha çok olmak üzere, bir yıl içinde spontan iyileşme gözlenir (43).

Kronik enfeksiyon: Bruselloz geçiren bazı hastalarda hastalığın semptomları başlangıçta sinsi olabilir. Akut ve kronik formları ayırt etmek zorlaşır. Şikayetler teşhisten sonra bir yılı aşkın süredir devam ediyorsa kronik bruselloz olarak tanımlanır. Bazı hastalarda kronik yorgunluk, depresyon ve eklem ağrıları gözlenir. Kronikleşme 40 yaşın altındaki hastalarda daha sık olup, çocuklarda çok nadir görülmektedir (44).

Relaps enfeksiyon: Tedaviden sonraki 12 ay içerisinde enfeksiyona ait belirti ve bulguların tekrarlamasıdır. Olguların %5'inden fazlasında relaps görülebilir. Genellikle hastalıktan 3-6 ay sonra gelişir. Genellikle viral bir hastalık veya travma sonrası ortaya çıkar. Yüksek ateş ve daha şiddetli semptomlarla seyredebilir (45).

2.5. Laboratuvar Tanısı

Brusellozun tanısı mikroorganizmanın klinik örneklerden izolasyonuna ve serolojik yöntemlerle antikor yanıtının gösterilmesine dayanmaktadır.

2.5.1. Bakteriyolojik Tanı

Bakteri kan ve kemik iliği kültürleri olmak üzere çeşitli klinik örneklerin kültürlerinden izole edilebilir. Kültür yapılması tanıdaki en önemli standarttır ve bakterinin izolasyonu gerçekleştiğinde kesin tanı konulur. Ancak kültürlerin duyarlılığı, örneğin alındığı evre (akut ya da kronik dönem), kullanılan besiyeri sistemi (otomatik ya da konvansiyonel kan kültürü sistemi vb.), örnek almadan önce antibiyotik tedavisinin başlanmış olup olmadığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (46). Akut dönemde kültürlerden izolasyon oranı %40 ila %90 arasında iken kronik ya da fokal enfeksiyonda, komplike vakalarda bu oran %5-20 kadar düşüktür. Kemik iliğinden izolasyon oranı kan kültürlerine nazaran %15-20 daha yüksek olabilir. Otomatize kan kültürü sistemlerinin izolasyon oranları konvansiyonel yöntemlerdir (47).

2.5.2. Serolojik Tanı

Kültürün dezavantajları nedeniyle serolojik tanı önem kazanmaktadır ve brusellozun tanısı yaygın bir şekilde serolojiye dayanmaktadır. Sıklıkla kullanılan serolojik tanı testi aglütinasyon testidir. Seroloji sonuçları ideal olarak *Brucella spp* enfeksiyonunu takiben gelişen antikor yanıtına göre yorumlanmaktadır. Önce immunoglobulin-M (IgM) ortaya çıkması'nın yükselişi takip eder. Tedavinin etkinliğini de antikor düzeyleri üzerinden izlemek mümkündür. İyileşme ile titrelerin giderek azaldığı görülür. Eğer titrelerde ısrarlı bir kalıcılık varsa bu klinisyen için bir komplikasyon, kronik enfeksiyon veya relaps bakımından uyarıcı bir durumdur. Ancak %20'ye varan oranlarda başarı ile tedavi edilmiş veya asemptomatik bireylerde antibiyotik titreleri yüksek kalabilmektedir (46).

Mevcut serolojik testler ile vakaların %95'ten fazlasına kesin bir tanı konulması mümkündür. Ancak, testlerin uygun kombinasyonlar halinde kullanılması gerekir. Bu kombinasyonlar aglütinan antikorları (IgM, IgG ve IgA) saptayan bir test (Rose Bengal ve STA; *Brucella* tam hücre antijeni) ile genellikle geç evrede gelişen non-aglütinan

antikorları saptayan bir testin (Coombs–IgG veya ELISA; *Brucella* ekstraktları, lipopolisakkarit veya protein antijenleri) kullanılması şeklinde özetlenebilir (46, 48).

Yakın zamanda 18-24 saate sonuç veren, hızlı ve kolay uygulanabilir bir ‘immunocaptur’ aglütinasyon testi uygulamaya girmiş olup, Coombs testi ile karşılaştırılabilir duyarlılıktadır. Endemik bölgelerde veya salgınlarda tarama amaçlı kullanım için bir immünokromatografik ‘dipstick test’ de geliştirilmiştir. Bu test; basit, hızlı, kullanımı ve yorumlanması kolay ve yüksek bir duyarlılığa (>%90) sahiptir (46). Brusellozun tanısında moleküler yöntemler de başarıyla kullanılmaktadır (49).

2.6. İmmün Yanıt

Canlılarda immüniteden sorumlu hücre ve moleküllerin oluşturduğu yapıya immün sistem, bu sistemin antijenlere karşı oluşturduğu reaksiyona ise immün yanıt adı verilmektedir (50). İmmün sistemin fizyolojik fonksiyonu, enfeksiyona neden olan mikroorganizmalara karşı vücudun savunulmasıdır. Bu savunma immün sistemin farklı mekanizmaları aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Bu mekanizmalar doğal bağışıklık ve kazanılmış bağışıklık mekanizmalarıdır (51).

2.6.1. Doğal İmmün Yanıt

Vücut savunması ilk olarak doğal bağışıklığın erken dönemdeki reaksiyonuyla başlamaktadır. Mikroorganizmalara karşı savunmanın erken basamakları doğal bağışıklığın bileşenleri tarafından oluşturulmaktadır. Bu bileşenler epitel doku ve antimikrobiyal ürünler gibi fiziksel ve kimyasal bariyerler, fagositler, kompleman sistem elemanları ve sitokinlerdir. Doğal bağışıklık mekanizmaları mikroorganizmaların sahip olduğu patojenle ilişkili moleküler örgüler (PAMP) adı verilen moleküler yapılar aracılığıyla tetiklenmektedir. Bu moleküler yapılar örgü tanıyan reseptörler (PRR) tarafından algılanmakta ve immün cevap oluşturulmaktadır. Doğal bağışıklık vücut savunmasının erken dönemini oluşturmaktadır ve enfeksiyöz ajanlara karşı özgülüğü ve çeşitliliği edinsel bağışıklığa göre daha sınırlı kalmaktadır (50, 51).

PRR’ler; PAMP’ları ve konak kaynaklı tehlike sinyalleri (DAMP) olarak bilinen uyarıcıları tanır (52). Genel olarak PAMP’lar LPS, peptidoglikan (PGN), flajellin ve nükleik asitler; virüs, bakteri, mantar ve protozoa’dan kaynaklanır. Konak immün

sistemi PRR'ler vasıtasıyla PAMP'lar ile etkileşime geçebilir. PRR'ler ya sitoplazmik zar da ya da endozomal vezikül içeren zar da yerleşiktir (53).

PAMP'ları tanıyan beş farklı tipte PRR tanımlanmıştır:

- a. Toll-benzeri reseptörler (TLR)
- b. (NOD)-benzeri reseptörler (NLR)
- c. Retinoik asit-indükleyen protein 1 (RIG-1)-benzeri reseptörler (RLR)
- d. C-tipi lektin reseptörleri (CLR)
- e. Absent in melanoma 2 (AIM2)-benzeri reseptörlerden (ALR'ler) oluşmaktadır (54).

Doğal immün sistem hücreleri PAMP ve DAMP'lara PRR'ler vasıtasıyla yanıt oluştururlar. Bu uyarılar zincirleme reaksiyonları harekete geçirerek immün sistemi aktive ederler. Bu zincirleme reaksiyonun ilk aşamasında mikrobiyal patojenlerin yüzeyindeki bir dizi PAMP konak hücredeki PRR'leri aktive etmektedir. PRR'ler ile PAMP arasındaki etkileşimden sonra, nükleusta aktifleşen transkripsiyon faktörlerinin translasyonu inflamatuvar sitokinlerin üretimine ve salınımına yol açar. Bu sitokinler; tip I interferon (IFN) ve enfeksiyonda etkin rol oynayan inflamatuvar veya anti-inflamatuvar sitokinlerdir (55).

2.6.2. Kazanılmış İmmün Yanıt

İmmün sistemin doğal immüniteye göre antijenlere karşı daha özgül ve daha güçlü yanıt veren şekli kazanılmış bağışıklık olarak adlandırılmaktadır. Edinsel bağışıklığın en önemli özelliği hafıza oluşturabilmesidir. Bu sayede vücut savunması aynı ajanla tekrar karşılaştığı zaman daha hızlı ve daha güçlü olarak yanıt verebilmektedir. Kazanılmış immün yanıt, antijen sunan hücrelerin protein yapıdaki antijenleri peptid yapıtaşlarına indirgeyip T-lenfositlerine sunmasıyla gerçekleşir. Lenfositler yüzeylerinde bulunan reseptörler aracılığıyla antijenleri tanırlar. Antijenler genellikle protein ya da polisakkarit yapıda olmalarına karşın lipid veya nükleik asit formları da mevcuttur (50, 51).

2.7. *Brucella* ve Konak İmmün Sistemi Arasındaki İlişki

Brucella vücuda sindirim sistemi, solunum yolları ya da deriden giriş yapmaktadır. Bakteri vücuda girdikten sonra giriş bölgesinin yakınında bulunan mononükleer ya da polimorfonükleer lökositler tarafından fagosite edilmektedir. Virulan *Brucella* türleri fagositozu inhibe edebilmektedir (56). B lenfositlerin yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanabilen lektin (şekerlere spesifik olarak bağlanabilen protein ya da glikoprotein yapısındaki maddeler), *Brucella*'ların hücre yüzeyinde de bulunmaktadır. Lektin ve benzeri yapıların reseptörler aracılığıyla immün sistem hücreleri haricinde diğer hücrelere de *Brucella* girişini sağladığı düşünülmektedir (57).

Brucella fagosite edildikten sonra en yakın lenf noduna taşınmaktadır. *Brucella* burada çoğalmaya başlamaktadır. İçinde bulunduğu hücrenin ölmesiyle birlikte bakteri ortama salınmakta ve kana geçerek bakteriyemiye neden olmaktadır. Kan yoluyla bakteri retiküloendoteliyal sisteme girmektedir. Bakterilerin çoğu karaciğer ve dalağa yerleşmektedir. *Brucella*'nın yapısında bulunan LPS'ye karşı antikör üretimi akut dönemin başlamasından birkaç gün sonra veya subakut olgularda belirtiler başladıktan sonra ortaya çıkmaktadır. *Brucella* antijenlerine karşı hücrel immün yanıt antikora bağımlı ya da antikordan bağımsız olarak gelişir. Bazı hastalar, hastalıkları boyunca tepkisiz kalabilmektedir. Çoğu hastada ise hem antikör yanıtı hem de hücrel immün yanıt gelişebilir (58).

2.8. Doğal İmmün Yanıtta İnflamazomların Önemi

Normal bir doku patojenle karşılaştığı zaman, burada bulunan hücrelerin PRR'lerinin patojene bağlanması sonucu doğal immün yanıt aktive olur. Doğal immün sistemin hücreleri konak savunmasında erken dönemdeki olayları düzenleme görevinin yanı sıra, dendritik hücreler aracılığı ile de adaptif immün sistemi devreye sokarlar. Tehlike sinyallerini ve patojenleri algılayan reseptörler hücrenin sitoplazmasında bulunur. Bu reseptör grubu içinde içinde inflamazomlar en iyi tanımlanan sistemlerden birisidir (59).

2.9. İnflamazom

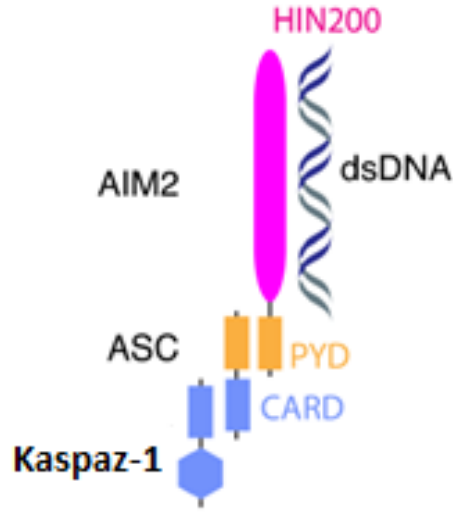
Doğal immünitede, pro-inflamatuvar CASPASE-1'in aktive olması için gerekli platformu oluşturan multiprotein kompleksine '**inflamazom**' adı verilir. Pro-inflamatuvar CASPASE-1'in aktif formu olan CASPASE-1; pro-IL-1 β ve pro-IL-18 proteolitik olarak ayırır ve IL-1 β ve IL-18'i aktif formlarına dönüştürür. Olgunlaşan sitokinler inflamatuvar yanıtları oluşturmak için hücreden salınır (52, 60).

İnflamazomlar yapısal olarak iki ana grupta incelenir. Bunlar; NOD-benzeri reseptör (NLR) ailesi ve pyrin ve HIN200 (PYHIN) domain içeren protein ailesi üyesidir. NLR ailesi; NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP12 ve NLRC4 inflamazom proteinlerini kapsar. Bu ailenin üyeleri bir adet nükleotid bağlayan domain (NOD), karboksil ucunda lösince zengin tekrarlar (LRR) içerirken ya pirin domaini ya da amino ucunda CASPASE aktive edici ve gerektirici domaini (CARD) veya her ikisini birden içerebilir (60). PYHIN ailesi üyeleri ise AIM2 ve interferon-indükleyici protein 16'dan (IFI16) oluşmaktadır. Bu ailenin üyeleri pirin domainine ek olarak bağlanmada rol alan 200 aminoasit tekrarlı hemapoietik interferon indükleyici nükleer protein (HIN200) domain yapısını içermektedir (61).

Araştırmamızda piroptoziste rol oynayan CASPASE-1, PYHIN ailesi üyesi AIM2 ve NLR ailesi üyeleri NLRP3, NLRC4 inflamazom proteinleri ile ilgili genel bilgiler aşağıda sunulmuştur.

2.9.1. AIM2 İnflamazom

AIM2 inflamazomu DNA'ya bağlanarak CASPASE-1'i aktive eder (62). AIM2, NLR ailesinin üyesi olan inflamazomlarla benzerlik gösterir. AIM2 inflamazomunun yapısı; amino ucunda bulunan pyrin domaini (PYD) ve karboksil ucunda bulunan HIN200 domaininden oluşur (Şekil 2.1). AIM2 sitozolde yerleşiktir (63, 64). AIM2 inflamazomunun CASPASE-1'i olgunlaştırması için çift zincirli ve 80 bp'den daha uzun bir DNA'ya ihtiyaç duyulur. Çift zincirli DNA varlığında, AIM2 inflamazomunda bulunan HIN domaini çift zincirli DNA'nın tanınmasını sağlar. Burada çift zincirli DNA'da, şeker fosfat omurgasının negatif ve HIN dominininin ise pozitif yüklü olması elektrostatik bir çekim oluşturmaktadır. Bağlanmadan sonra pyrin, PYD/HIN kompleksinden ayrılır. Bu olay vasıtasıyla DNA sarmalı boyunca inflamazom kompleksinin oluşumu sağlanır (65).



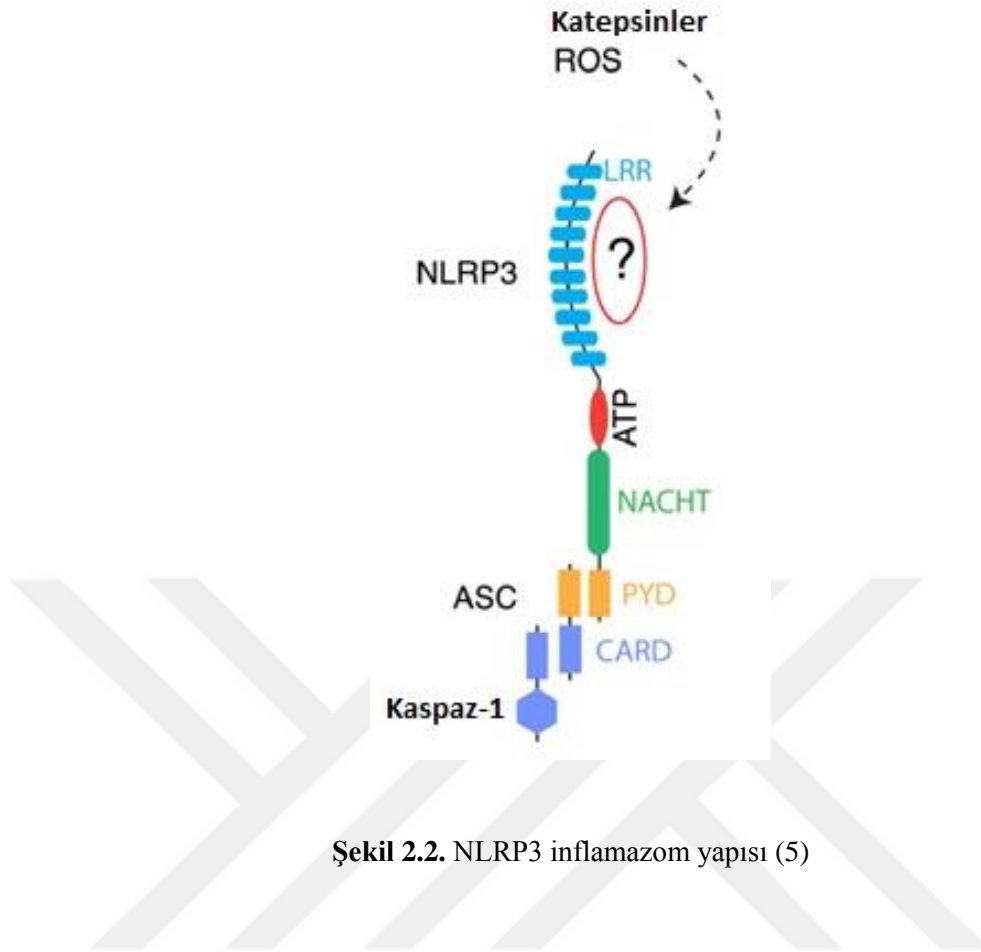
Şekil 2.1. AIM2 inflamazom ve çift zincirli DNA ile beraber temsili görüntüsü (5)

2.9.1.1. İnflamasyon Esnasında AIM2'nin Fonksiyonu

Fizyolojik hastalık modellerinde DNA'da AIM2 aktivasyonu gösterilememiştir (66). Ancak çoğu mikrobiyal işgalciler fagositik hücrelerin sitozolüne ulaşır ve AIM2'yi tetikler. CASPASE-1'i aktive etmek için yabancı DNA salınabilir. Bu tip bir aktivasyon *Francisella tularensis* (67, 68), *Listeria monocytogenes* (69) ve *Legionella pneumophila* suşları (70) gibi bakteriyel patojenlerin enfeksiyonlarında gösterilmiştir.

2.9.2. NLRP3 İnflamazom

NLRP3 inflamazomu 3 kısımdan meydana gelmektedir. Karboksil ucunda bulunan LRR'ler, merkezde bulunan nükleotid bağlayan oligomerizasyon domaini (NACHT) ve amino ucunda pyrin domaini (PYD) içerir (71) (Şekil 2.2). NLRP3 inflamazomu makrofaj, mikrogliya gibi immün sistem hücrelerine ulaşan tehlike sinyallerini tanıyarak IL-1 β ve IL-18 aracılı inflamatuvar yanıtlarının oluşmasında görev alan bir multiprotein kompleksidir. NLRP3 oldukça geniş bir yelpazede tehlike sinyali tanıma özelliğine sahip olmasıyla diğer NLR ailesi üyelerinden ayrılmaktadır (72).



Şekil 2.2. NLRP3 inflamazom yapısı (5)

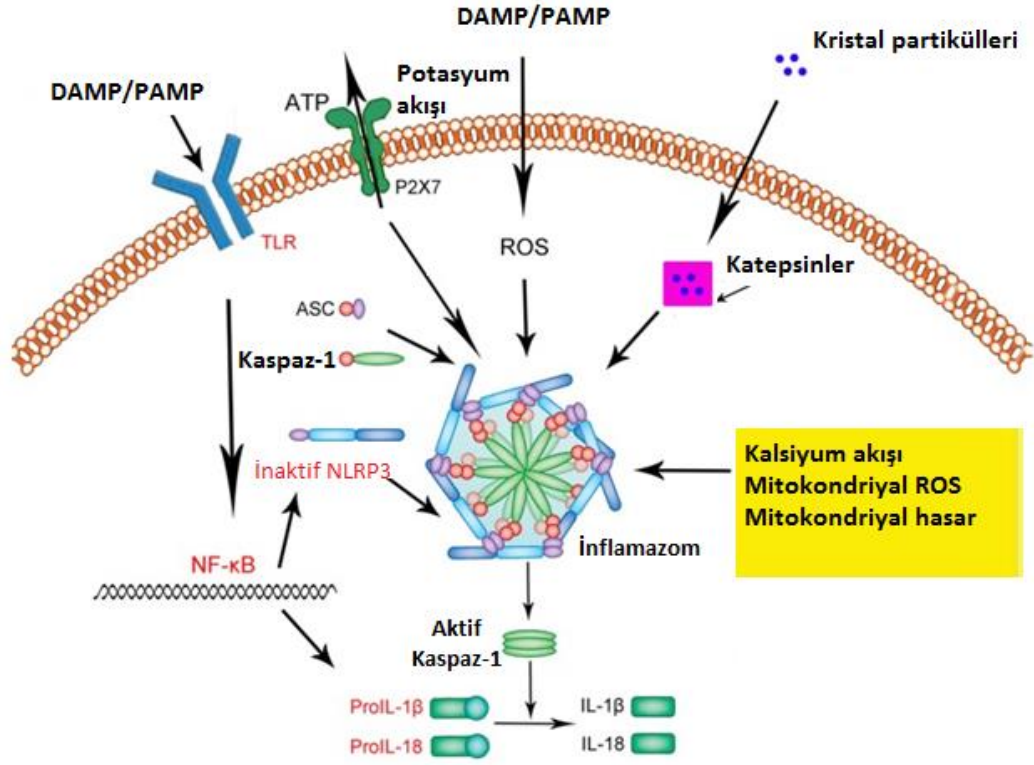
2.9.2.1. İnflamasyon Esnasında NLRP3'ün Fonksiyonu

S.aureus ve *E.coli* gibi patojenik bakterilerin artışı durumunda NLRP3 alt üniteler uyarılarak aktif NLRP3 inflamazomunu oluştururlar (73). *Schistosoma mansoni* (74) ve *Dermatophagoides pteronyssinus* (75) gibi parazitlerin varlığında da NLRP3 ün aktive olduğu gösterilmiştir (52, 76). Hücre dışı ATP, ürik asit kristalleri (77), fibriler amiloid beta (78), kolesterol kristalleri (79), silika kristalleri (80) asbestos lifleri (80) ve nanomateryaller (81) gibi endojen DAMP'ların NLRP3 inflamazom aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir.

NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu için öncelikle makrofaj ya da mikroglia hücrelerine bir tehlike sinyalinin ulaşması gerekmektedir. Söz konusu tehlike sinyali; PAMP ve DAMP olmak üzere iki farklı yapıdadır. Bu moleküler sinyallerin makrofaj ya da glia hücre zarında yerleşim gösteren TLR'ler tarafından tanınması sonucu Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin gen ifadesi ve salınımı artar. Diğer taraftan, IL-1 β ve IL-18 üretimi inflamazom aktivasyonunu gerektiren iki aşamalı bir süreçtir. TLR'lerin uyarılmasıyla her iki proinflamatuvar

sitokinin öncül formları olan pro-IL-1 β ve pro-IL-18'in NF- κ B aracılı gen transkripsiyonu meydana gelir. Pro-IL-1 β ve pro-IL-18'in ise aktif türevleri olan IL-1 β ve IL-18'e dönüşümleri için NLRP3 aracılı inflamazom aktivasyonu ile pro-CASPASE-1'in CASPASE-1'e dönüşümü gereklidir. CASPASE-1; pro-IL-1 β ve pro-IL-18'in IL-1 β ve IL-18'e dönüşümünü gerçekleştirir. TLR'lerin aktive olmasıyla pro-IL-1 β ve pro-IL-18'in yanında NLRP3'ün de NF- κ B aracılı gen transkripsiyonu artar (82).

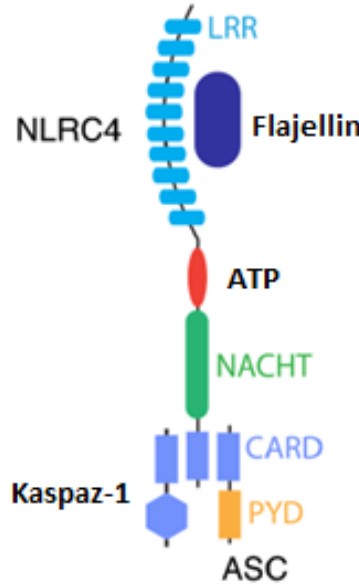
NLRP3'ün aktive olması için hücre zarında yerleşim gösteren katyon kanalı ile birleşik olan iyonotropik P2X7 reseptörlerinin ATP ile aktive olması ve K⁺ iyonunun hücre içine girmesi gereklidir. K⁺ iyonunun hücre içine girmesi ile inaktif durumdaki NLRP3'ün multiprotein kompleks yapıdaki NLRP3 inflamazomuna dönüşümü gerçekleşir. NLRP3'ün P2X7 reseptörleri aracılığıyla aktive olması sonucu yapıya Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) proteini ve pro-CASPASE-1'in bağlanmasıyla inflamazom yapısı oluşur ve daha sonra CASPASE-1'in aktivasyonu gerçekleşir. ASC proteini içeriğindeki pyrin yapısıyla NLRP3'ün pyrin bölgesine, CARD yapısıyla ise pro-CASPASE-1'in CARD yapısına bağlanarak CASPASE-1'in oluşumuna aracılık etmektedir. Sonuçta CASPASE-1 aktivasyonu ile pro-IL-1 β ve pro-IL-18'in aktif şekilleri olan IL-1 β ve IL-18 üretimi gerçekleşir (83). CASPASE-1 aktivasyonu ile ayrıca pyroptosis aracılı hücre ölümü indüklenmektedir (84) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. NLRP3 İnflamazomunun aktivasyonu (85)

2.9.3. NLRC4 İnflamazom

NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4), merkezi bir NACHT domaini, karboksil ucunda LRR domaini ve amino ucundaki CARD yapılarından oluşur (Şekil 2.4). NLRC4 ün CARD yapısı ile pro-CASPASE-1'in CARD yapısı arasında CARD-CARD etkileşimi olduğu gösterilmiştir (86). NLRC4 iflamazomunda bir ASC yapısı bulunmaz hücre ölümü ASC'den bağımsız olarak meydana gelir (87, 88).



Şekil 2.4. NLRC4 inflamazomunun yapısı (5)

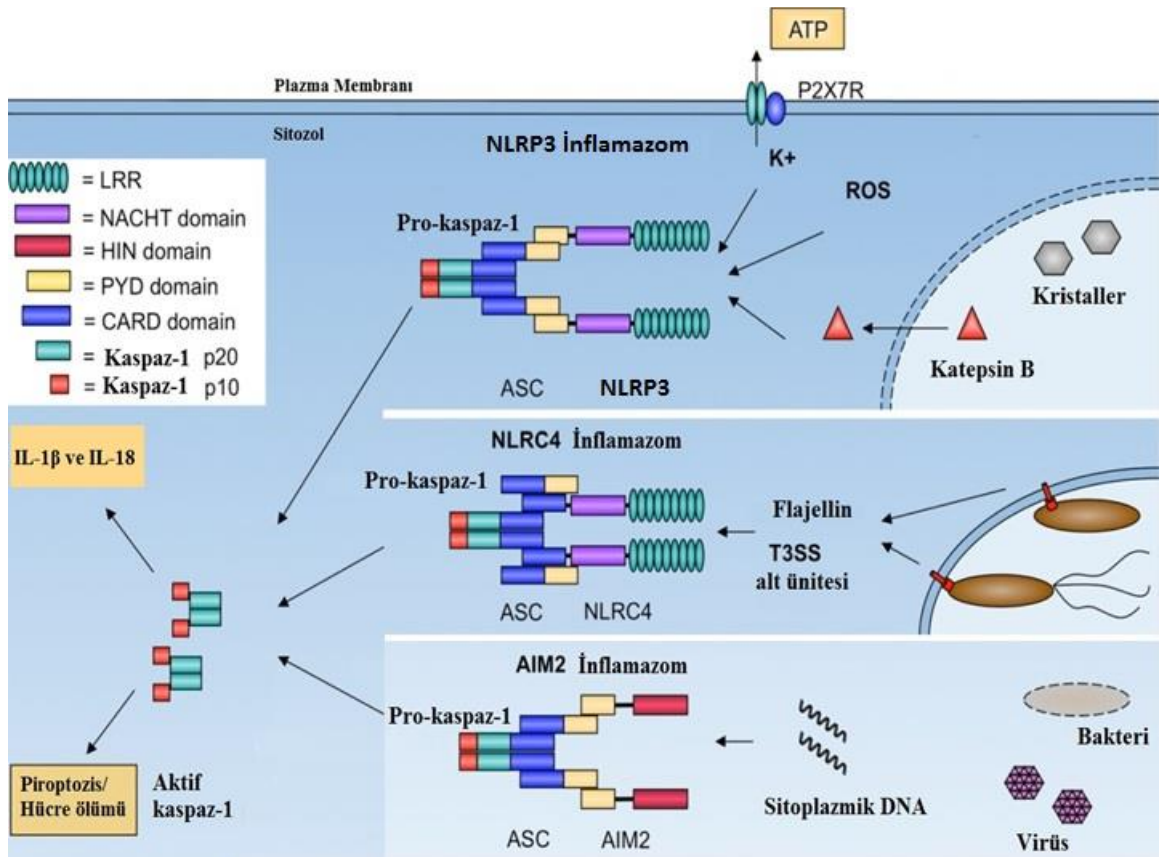
2.9.3.1. İnflamasyon Esnasında NLRC4'ün Fonksiyonu

NLRC4 inflamazom, özgül olarak *Salmonella typhimurium* (89), *Legionella pneumophila* (90), *Shigella flexneri* (91) ve *Pseudomonas aeruginosa* (92) gibi çeşitli gram negatif bakterilerin makrofajları enfekte etmesi sonucu oluşan bir inflamazomdur.

Gram negatif bakteriler ile NLRC4 inflamazomunun aktivasyonu üzerine yapılan çalışmalar bakteriyel tip III sekresyon sisteminin (T3SS) CASPASE-1 ayrışması için gerekli olduğu gerçeğini açığa çıkarmıştır. Tip III sekresyon sistemi ile bakteri sitoplazmik membranından konak hücre sitoplazmik membranına doğru kanal benzeri porlar oluşur. Bu porlar sayesinde bakteriye ait proteinlerin bakteri sitoplazmasından konak hücre sitoplazmasına doğrudan ulaşması sağlanır. Bakteri kolon epitel ile temasa geçtiği zaman tip III sekresyon sistemi sayesinde aktin sistemini polimerize ve depolimerize edebilir. Bu değişim bakterinin, fagositik hücrede yalancı ayak şeklinde çıkıntılar oluşturmasına neden olur ve bakteri fagosite edilerek vakuol içinde tutulur. Bundan sonra bakteriye düşen görev vakuol membranını parçalayarak sitoplazmaya ulaşmaktır (93). Flajellin de T3SS vasıtasıyla konak hücreye girebilir (94). Flajellin sitozole girdiğinde NLRC4 inflamazom alt üniteleri birleşir. Aktif inflamazom yapısı oluşur. NLRC4, CARD yapısı bulunduran ASC adaptör proteinini gerektirir. NLRC4'ün CARD yapısı ile pro-CASPASE-1'in CARD yapısı etkileşime girer. Pro-

CASPASE-1 proteolitik olarak kesilerek aktif CASPASE bir oluşumu sağlar. CASPASE-1’de inflamatuvar sitokinlerden IL-1 β ve IL-18’in olgunlaşmasını ve salınımını sağlayarak inflamatuvar yanıtın oluşmasını sağlar (95).

İnflamazomlar çeşitli hücre içi uyarıcıların varlığında inaktif olan alt üniteleri birleşerek aktif inflamazom multi protein kompleksleri oluşmaktadır. Oluşan inflamazomlar pro-CASPASE-1’i proteolitik olarak keserek CASPASE-1’i oluşturur. Daha sonra CASPASE-1 ise inflamatuvar sitokinlerin olgunlaşmasına ve salınımına yol açar. Böylece çeşitli inflamatuvar yanıtların oluşumu sağlanır (5) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. İnflamazomların etki mekanizması (5)

2.9.4. CASPASE-1

Caspase’ler (Cystein dependent Aspartate Spesifik Proteinase) zimojen olarak sitoplazmada bulunan sistein proteazlarıdır. IL-1 β dönüştürücü enzim olarak bilinen CASPASE-1, inflamasyonda ve hücre ölümünde önemli bir rol oynar (96). Caspase-1, yalnız IL-1 β ’ya özgü değildir ve şu ana kadar çeşitli hücre tiplerinde 40’tan fazla

hücrel substratı tanımlanmıştır. Aktin, pirin, CASPASE-7 gibi substratlardan başka glikoliz enzimlerinden aldolaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, piruvat kinaz gibi enzimleri aktive etmektedir (97).

İnflamazom, Caspase-1 aktivasyonuna yol açan multiprotein kompleksidir. Caspase-1'in aktive olması inflamatuvar sitokinler IL-1 β ve IL-18 olgunlaşmasına yol açar (98). IL-1 β ve IL-18 aktivasyonu ve salınımı iki sinyal gerektirir: birinci sinyal belirli uyarıların varlığında sitoplazmada dağınık olan alt ünitelerin bir araya gelip aktif bir inflamazom kompleksi oluşumu ve Caspase-1 aktivasyonudur. İkinci sinyal ise pro-IL-1 β ve pro-IL-18'in aktivasyonudur (99).

2.10. Piroptosis ve CASPASE-1

Piroptosis hem apoptoz hem de nekroz özellikleri gösteren, CASPASE bağımlı, proinflamatuvar bir hücre ölümü çeşididir (98). CASPASE-1 aktivasyonu IL-1 β ve IL-18'in salınımının yanı sıra piroptosis indüksiyonunu da içerebilir (99).

Piroptosis enfeksiyon varlığında sık sık indüklenir ve piroptosis sonucunda hücre artıkları hücre dışı alana salınır. Piroptotik ölüm ATP gibi bileşenlerin sitozolik salınımına yol açarak inflamasyonu ortaya çıkarır. İnflamatuvar sitokinler olan IL-1 β ve IL-18 de bu sürece eşlik ederler (98, 100).

2.11. İnflamasyon esnasında CASPASE-1

İnflamasyon için bir uyarıcının varlığında; ASC proteini, pro-CASPASE-1 ile birleşerek inflamazom kompleksinin aktivasyonunu sağlar. Bu kompleks pro-Caspase-1'i aktif formu olan CASPASE-1'e dönüştürür. Oluşan aktif Caspase-1, proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 β ve IL-18'i aktif formlarına çevirir. Aktifleşen sitokinler özgül reseptörlerine bağlanarak akut inflamasyonun oluşumunda rol oynar (101).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) cihazı (Corbett)

Gerçek zamanlı PZR cihazı (QIAGEN-Rotor Gene Q)

DNA/RNA ölçüm cihazı (MAESTRO)

Hassas terazi (Sartorius)

Elektroforez güç kaynağı (BIO-RAD)

pH metre (pHep® by Hanna)

Jel görüntüleme sistemi (Kodak Gel Logic 2200 Imaging System)

-80 °C Derin dondurucu (Heraeus)

Masaüstü santrifüj cihazı (Hettich-zentrifugen)

Mikro santrifüj cihazı (Hettich-zentrifugen)

Hassas otomatik pipetler ve uçları (Eppendorf)

- 0,5-10 µL Eppendorf otomatik pipet
- 20-200 µL Eppendorf otomatik pipet
- 100-1000 µL Medisis otomatik pipet

Vorteks (VORTEXMIXER)

Manyetik karıştırıcı (Gerhardt)

Su saflaştırma sistemi (Millipore)

EDTA'lı tüp (BD Vacutainer; Lot no:5097279)

3.2.Kullanılan Kimyasallar

RNAaz mini kit (QIAGEN; QIAamp RNA Blood Mini Kit (50); Lot no: 133210822)

cDNA sentez kiti (QIAGEN; RT2 HT First Standard Kit; Lot no: 74501035)

Real time PZR kiti (QIAGEN; RT² SYBR[®] Green FAST Mastermixes; Cat no: 330620)

Primerler (QIAGEN; RT² qPCR Primer Assays (200); Cat no: 330001)

DNA ladder (BIOMATIK; Lot no:026)

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA; C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈. 2H₂O; FW: 372,24; Lot no: 48H0287)

Tris Baz (C₄H₁₁NO₃; FW: 121,14; Lot no: 83H5734)

Borik asit (H₃BO₃; FW:61,843; Carlo Erba Lot no:302177)

Etidyum Bromür (C₂₁H₂₀N₃.Br; FW: 394,32; Lot no: E8751)

Agaroz (Lot No: 5093)

Sodyum Hidroksit (NaOH; FW:40,00; Lot no: S8045)

Hidroklorik asit (HCl; FW:36,46; Lot no: H1758–1 l)

Beta-merkaptotanol (C₂H₆OS; FW: 78,13; Lot no: M3148)

Ethanol (C₂H₅OH; MERCK; Lot no: a8250)

3.3. Hasta Tanımı ve Sayısı

Bu araştırma için, Malatya Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 13/06/2013 tarihli ve 2013/77 protokol numaralı kararı ile etik onay alındı (Ek-1). Araştırmada; İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi ve Malatya Devlet Hastanesi'ndeki 18-65 yaş arası, herhangi bir alt hastalığı olmayan, gönüllü 19 akut bruselloz hastası ile yine 18-65 yaş arası 19 sağlıklı vericiden periferik kan örneği alındı. Çalışmaya gönüllü olarak katılmak isteyen bireyler hasta bilgilendirme formunu okuyup imzaladıktan sonra çalışmaya katılmaları sağlandı (Ek-2).

3.4. Araştırmaya Dahil Olma Kriterleri

Sekiz haftadan kısa süredir bruselloz ile uyumlu semptom ve bulguları olan hastada aşağıdakilerden birinin bulunması akut bruselloz olarak tanımlandı.

- Serum *Brucella* aglutinasyon titresi $\geq 1/160$ bulunması,
- İlk serum örneğinden ≥ 15 gün sonra alınan serumda en az dört kat titre artışı saptanması,
- Kan veya diğer klinik örneklerin herhangi birinde *Brucella spp.*'nin üretilmesi.

Akut bruselloz tanısı konan ve bu çalışmaya katılmak için gönüllü olan, önceden bilinen alt hastalığı olmayan 18-65 yaş arası hastalar alındı.

3.5. Araştırmadan Çıkarılma Kriterleri

Akut bruselloz hastalarında ve sağlıklı bireylerde travma, HIV(+), HCV(+), böbrek yetmezliği olan, nötropeni olan, HbsAg(+), immün baskılayıcı ilaç alan, otoimmün hastalığı olan, akut veya kronik pankreatit, yanık tedavisi gören, gebeliği olan, steroid ilaç kullanan, diyabet hastaları ve herhangi bir malignitesi tespit edilen bireyler çalışmadan çıkarıldı.

Herhangi bir şikayeti olmayan kişiler arasından, bu çalışmaya katılmak için gönüllü olanlardan çalışmaya alınan her hasta için aynı yaş ve cinsiyette olacak şekilde, serum *Brucella* aglutinasyonu çalışılarak negatif bulunanlar sağlıklı gönüllü olanlar seçildi.

3.6. Dokuların Alınması ve Örneklerin Analizi

Gönüllü hastalardan ve kontrol grubu vericilerinden intravenöz yolla alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplere konuldu. Hastalardan alınan kan örneklerindeki *AIM2*, *NLRP3*, *CASPASE-1* ve *NLRC4* mRNA seviyelerinin tespiti için, QIAGEN firmasının ürettiği QIAamp RNA Blood Mini Kit'i kullanıldı.

3.7. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

3.7.1. 5X Tris-Borat-EDTA (TBE) Çözeltisinin Hazırlanması

1 litre 5X TBE çözeltisi hazırlamak için 54 gr TRIS baz, 27.5 gr Borik Asit ve 20 ml 0.5 M EDTA çözeltisi hazırlanarak 900 ml bidistile su içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Çözeltinin pH değeri 8.0 oluncaya kadar HCl eklendi. Çözeltinin toplam hacmi 1000 ml'ye tamamlandı ve son olarak 121°C'de 20 dakika otoklavlandı. Daha sonra deneyler sırasında bu çözelti 1X konsantrasyonuna düşürülerek ve pH değeri tekrar 8.0'a ayarlanarak çalışmalarda kullanıldı.

3.8. Toplam RNA Saflaştırılması (QIAamp RNA Blood Mini Kit Protokolü)

Dokulardan toplam RNA saflaştırması firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki metoda göre yapıldı. Bu protokole göre; 1ml kan üzerine 5 ml eritrosit liziz buffer eklendi. Daha sonra +4°C'de 15 dakika bekletildi. Daha sonra 1400 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant sıvısı döküldükten sonra üzerine 2 ml eritrosit liziz buffer eklendi. Daha sonra 1400 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Dibe çöken eritrosit peletini kaldırmadan süpernatant döküldü. Ependorfdaki peletin üzerine 600 µl RLT eklenerek karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 700 µl kit kolonuna eklendi ve 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon altındaki tüpe süzülen çözelti steril bir ependorfa alındı ve üzerine 600 µl %70'lik etanol eklendi, daha sonra bu karışımın 700 µl'si yeni bir spin kolonuna eklendi ve 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolon altındaki tüp değiştirilerek 700 µl RW1 buffer eklendi ve 15 saniye 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra tekrar kolon altındaki tüp değiştirildi. Kolona 500 µl RPE buffer eklendikten sonra 15 saniye 10000 rpm de santrifüj edildi. Yeni bir tüp takıldı ve kolona 500 µl RPE solüsyonu eklendi. 3 dakika 12000 rpm'de santrifüj edildi ve alttaki

tüp döküldü. Daha sonra 1 dakika 14000 rpm’de santrifüj edildi ve kolon steril bir ependorf tüp içerisine oturtuldu. Kolona 50 µl RNase içermeyen su eklendi ve 1 dakika 12000 rpm’de santrifüj edildi. Son olarak RNA numuneleri -80 °C derin dondurucuya konularak cDNA üretimi için saklandı.

3.9. RNA’nın Agaroz Jele Yükleme İşlemleri

“QIAamp RNA Blood Mini Kit” ile kan örneklerinden saflaştırılan toplam RNA’larda herhangi bir yıkımın olmadığını belirlemek amacıyla örnekler jel elektroforezinde analiz edildi. Örnekler % 1.5 agaroz jelinde ve 1X TBE tamponu ile 100 mV’de elektroforez işlemine tabi tutuldu. RNA görüntülemesi “Kodak Gel Logic 2200 Imaging System” ile ultraviyole ışık altında gerçekleştirildi. RNA miktarının belirlenmesi amacıyla RNA ölçüm cihazı kullanıldı.

3.10. cDNA Sentez Protokolü

cDNA sentezi için QIAGEN firmasının ürettiği “RT² HT First Standard Kit” kullanıldı. cDNA sentezi firmanın önerdiği şekilde yapıldı. RNA örnekleri kitede belirtilen 25 ng-5 µg aralıkta olmak üzere, her örnek için 1 µg RNA alındı. Kısaca 100 µl’lik PZR tüpüne 6 µl GE2 solüsyonu ve 1 µg RNA eklendi. 1000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra 37 °C’de 5 dakika PZR makinesinde ısıtıldı. Bu karışımın üzerine 6 µl BC4 solüsyonundan eklendi. 1000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Karıştırılan numuneler PZR makinesinde 42 °C’de 15 dakika, 95 °C’de 5 dakika ve 4 °C’de 5 dakika ısıtıldı. Daha sonra -20 °C’de analize kadar saklandı.

3.11. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü

Gerçek zamanlı PZR analizi; QIAGEN-Rotor Gene Q gerçek zamanlı PZR cihazı, QIAGEN firmasının ürettiği “SYBR[®] Green FAST Mastermixes” ve “RT² qPCR Primer Assays” kullanılarak yapıldı. Reaksiyonlar 25 µl toplam hacimde hazırlandı. Bunun için 12.5 µl RT2 SYBR Green Mastermix, 6.5 µl RNAaz free water, 5 µl cDNA ve RT² qPCR Primer Assay 1 µl olacak şekilde hazırlandı. PZR şartları firmanın önerdiği şekilde yapıldı ve 40 döngü tekrarlandı. Tablo da özellikleri verilen

primerler *AIM2*, *NLRP3*, *CASPASE-1* ve *NLRC4* gen ifadelerinin analizinde kullanıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Primer özellikleri

Genler	Referans segment numarası	Referans pozisyonu	Band aralığı (bp)
<i>AIM2</i> ; Absent in melanoma 2	NM_004833.1	1221	114
<i>NLRP3</i> ; NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3	NM_183395.2	3365	142
<i>CASPASE-1</i> ; Cystein dependent Aspartate Spesifik Proteinase-1	NM_033292.2	1052	81
<i>NLRC4</i> ; NOD-like receptor family, Caspase Recruitment Domain-Containing 4	NM_021209.4	3273	183
<i>GAPDH</i> ; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	NM_002046.3	756	130

3.12. İstatistiksel analizler

Verilerin istatistikî analizinde Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra; gruplar arası karşılaştırmalarda Mann Whitney U test kullanıldı. İnflamazom genleri ile Caspase-1 geninin ifade edilme düzeyleri arasında korelasyon analizi Pearson Korelasyon analizi ile gerçekleştirildi. Karşılaştırmalarda “p” değerinin 0,05 den küçük bulunduğu değerler istatistikî olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

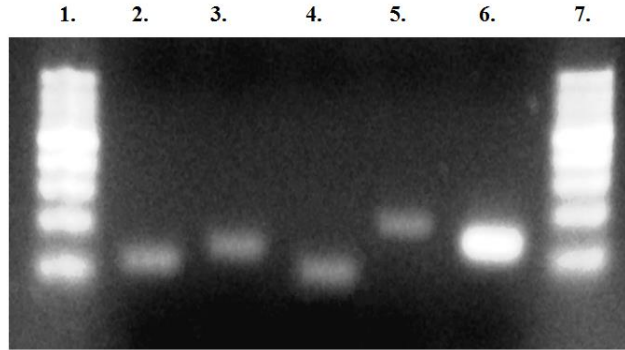
4.1. Moleküler Genetik Bulgular

Dokulardan saflaştırılan RNA miktarı RNA ölçüm cihazında okundu ve örneklerin saflık düzeyi 260/280 ve 260/230 değerleri ile tespit edildi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. RNA ölçüm sonuçları

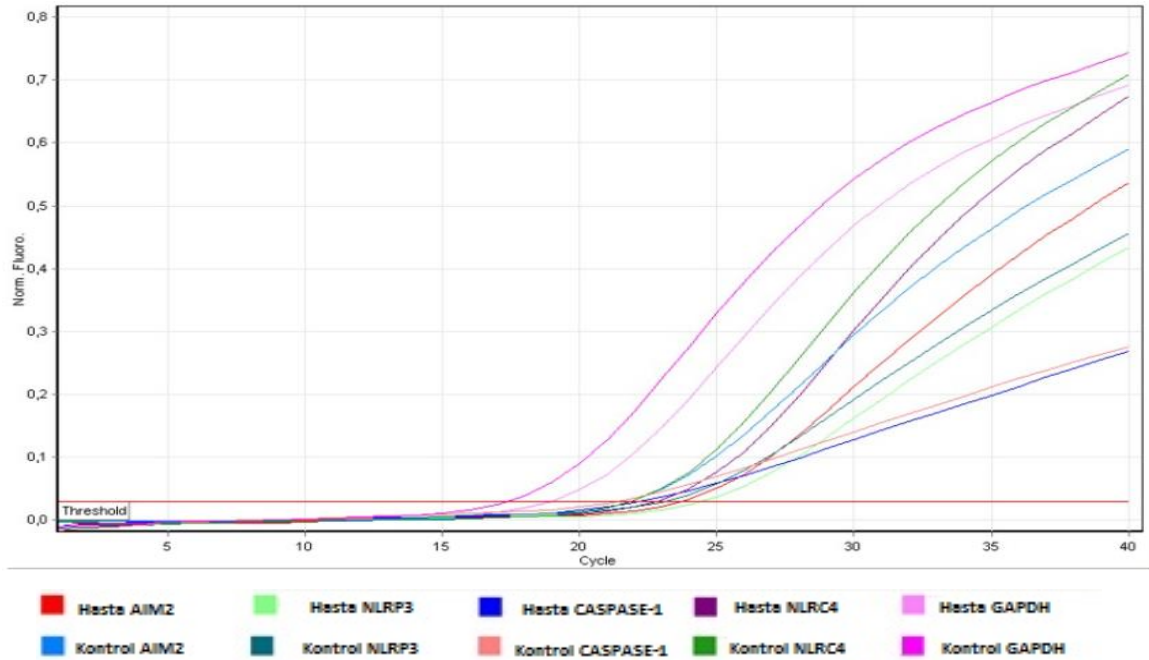
	AKUT BRUSELLOZ			KONTROL		
	RNA(ng/ µl)	260/280	260/230	RNA(ng/ µl)	260/280	260/230
1	53,25	2,013	2,032	67,59	2,001	2,073
2	51,26	1,916	2,143	59,76	2,031	2,049
3	34,27	1,992	2,054	57,16	2,015	2,024
4	59,72	2,020	2,066	43,4	2,051	2,056
5	62,08	2,045	2,009	36,34	2,007	2,070
6	37,21	2,029	2,053	102,6	2,059	2,043
7	97,34	1,903	1,987	111,78	2,032	2,065
8	47,61	2,014	2,032	72,9	1,961	1,921
9	57,86	2,023	2,023	68,3	2,039	2,025
10	62,34	1,995	2,067	78,54	2,064	2,033
11	46,66	2,021	2,030	56,21	2,003	2,030
12	43,27	2,019	2,036	36,54	2,057	2,028
13	44,63	1,954	2,030	62,27	1,995	1,981
14	38,41	2,003	2,027	52,73	2,071	2,022
15	27,51	2,043	1,997	41,29	2,092	1,929
16	21,35	1,997	2,020	42,32	1,996	2,019
17	69,38	2,065	2,005	47,61	2,008	2,003
18	39,25	1,992	1,998	39,25	1,981	1,979
19	45,51	2,001	2,007	28,56	1,972	1,978

RNA izolasyonu sonrası gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR reaksiyonu sonrası örneklerdeki DNA miktarı agaroz jel elektroforezi ile tespit edildi (Şekil 4.1).



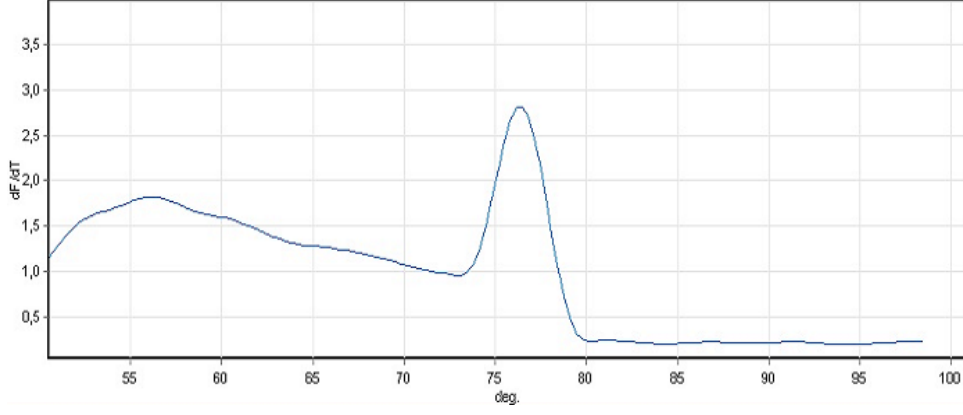
Şekil 4.1. Sağlıklı kontrol grubuna ait bir periferik kan örneğinden RNA izolasyonu sonrası cDNA eldesi ve real time PZR sonunda PZR ürünü DNA örneklerinin jel elektroforezinde yürütülmesi (%2 agaroz jelde 45 dakika 90Volt) sonrası görüntülenmesi. 1. ve 7. 100bp'lik DNA marker (Biomatik); 2., *AIM2* (114 bp); 3., *NLRP3* (142 bp); 4., *CASPASE-1* (81 bp); 5., *NLRC4* (183 bp); 6., *GAPDH* (130 bp) DNA örneklerini göstermektedir.

Her bir örnekten saflaştırılan RNA'lerden elde edilen cDNA'lar, *AIM2*, *NLRP3*, *CASPASE-1*, *NLRC4* ve housekeeping gen olan *GAPDH* genlerine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile çoğaltıldı (Şekil 4.2).

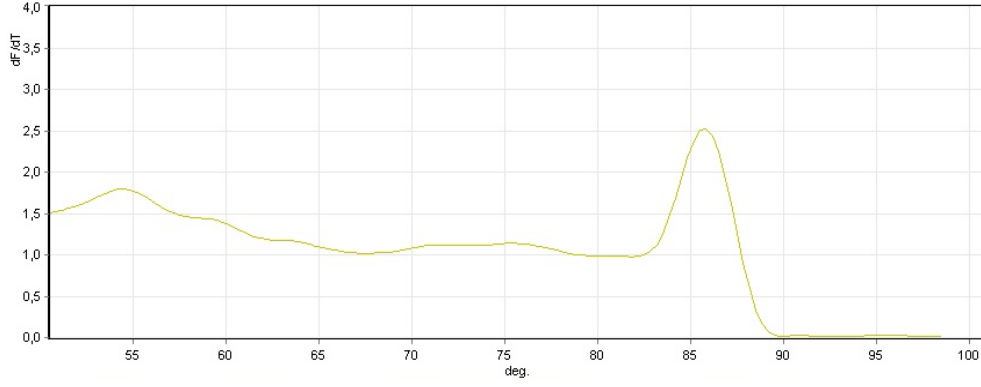


Şekil 4.2. mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltımı sırasındaki oluşan çoğalım eğrileri

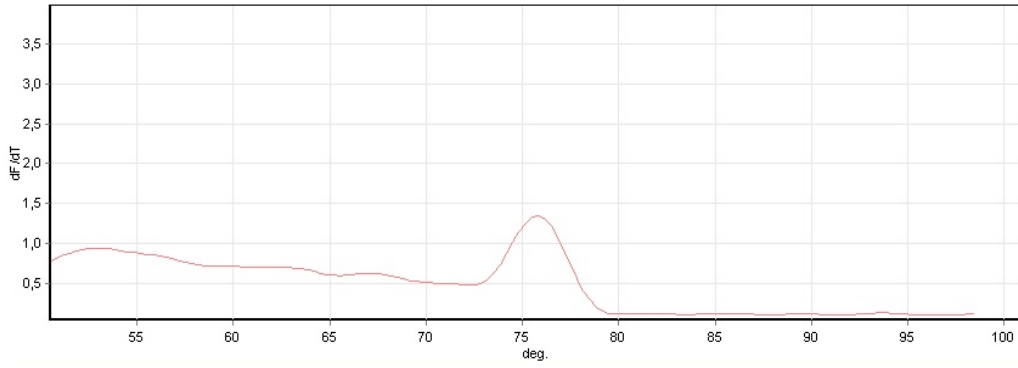
Her bir gen için melting point grafiği aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.3-4.7).



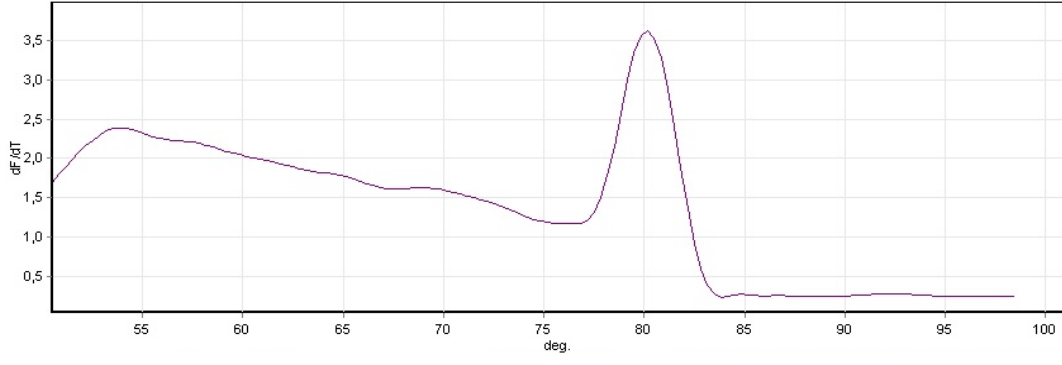
Şekil 4.3. *AIM2* geninin erime noktası grafiği



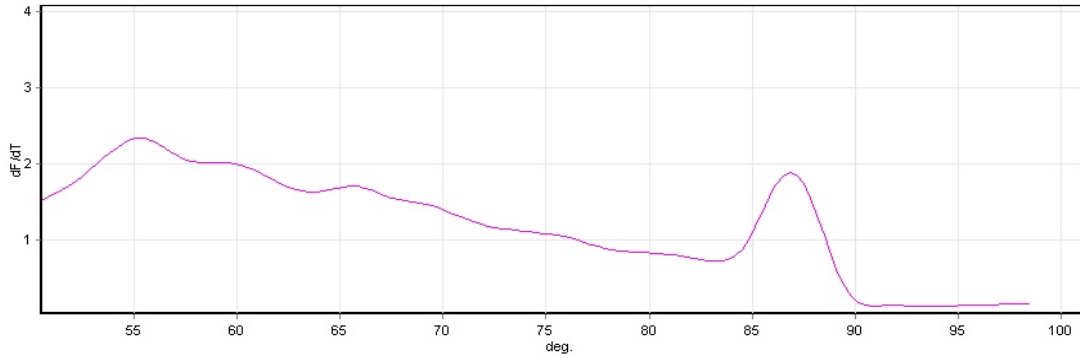
Şekil 4.4. *NLRP3* geninin erime noktası grafiği



Şekil 4.5. *CASPASE-1* geninin erime noktası grafiği



Şekil 4.6. *NLRC4* geninin erime noktası grafiği



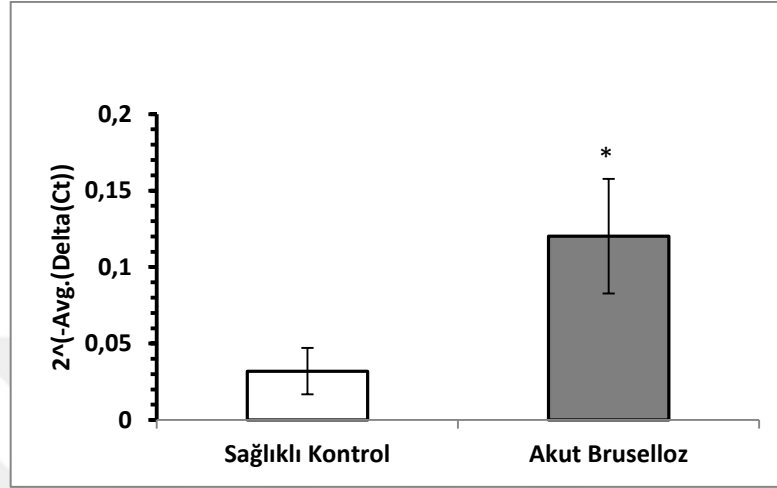
Şekil 4.7. *GAPDH* geninin erime noktası grafiği

Real time PZR uygulamalarında normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ekspresyonu değişmediği bilinen bir referans gene ihtiyaç vardır. Çalışmamızda referans gen olarak *GAPDH* kullanılmıştır. *GAPDH* geni için $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) değerleri aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Referans gen olan *GAPDH* için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri

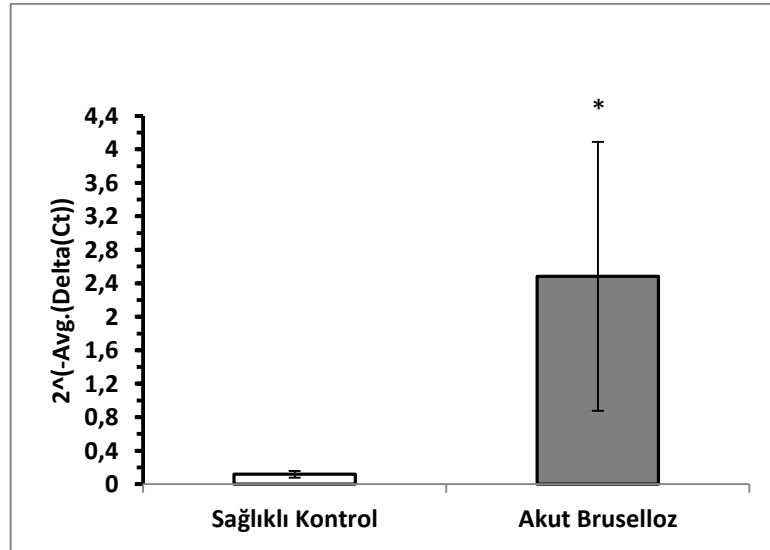
GAPDH	SAĞLIKLI	HASTA
1	2,14746	5,305709
2	1,493580	1,723829
3	1,756412	0,405978
4	0,780587	0,336686
5	0,994906	1,222194
6	1,882476	0,659513
7	4,699905	0,020046
8	0,401266	0,645941
9	0,218035	5,57694
10	0,330479	2,53059
11	0,314827	0,301342
12	9,2704	0,57414
13	0,142856	0,394877
14	0,2897	0,524667
15	2,177438	1,515164
16	0,171067	0,441191
17	0,359143	0,244766
18	2,625572	0,562324
19	0,210608	1,646581

Araştırmamız sonucunda akut bruselloz grubunda *AIM2* ve *NLRC4* genlerinin ifade edilme düzeyi sağlıklı gruba göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (şekil 4.8-4.9).



şekil 4.8. Hasta ve kontrol grubundaki *AIM2* gen ifadelerinin karşılaştırılması

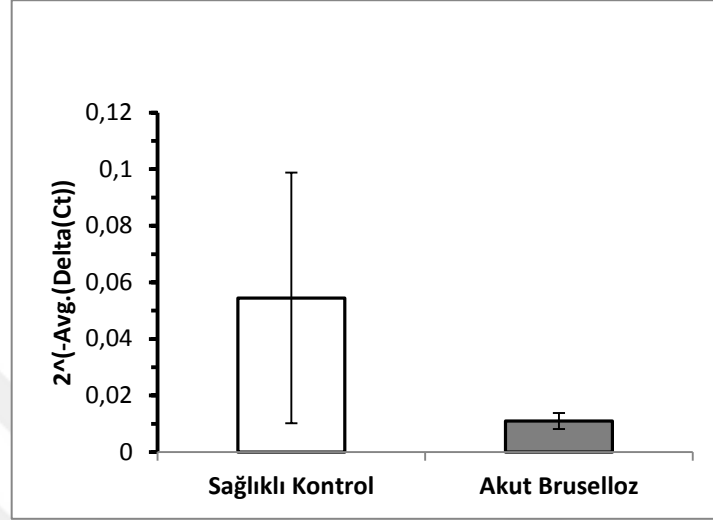
* simgesi grubun kontrol grubundan istatiki olarak farklı olduğunu ifade eder ($p < 0.05$)



şekil 4.9. Hasta ve kontrol grubundaki *NLRC4* gen ifadelerinin karşılaştırılması

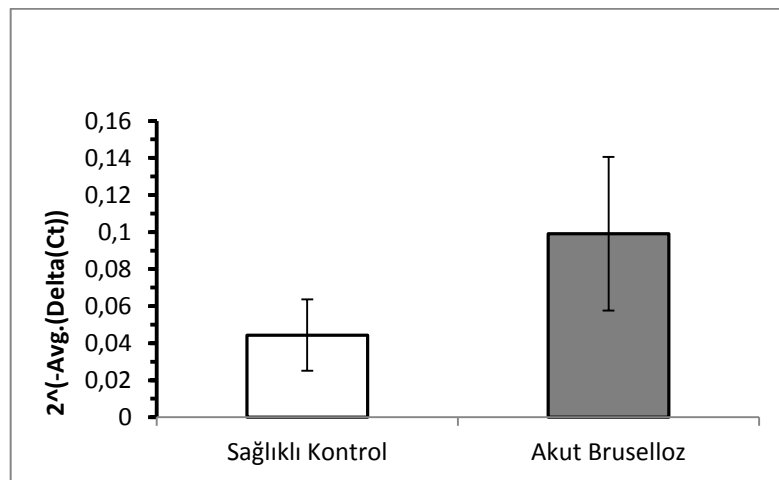
* simgesi grubun kontrol grubundan istatiki olarak farklı olduğunu ifade eder ($p < 0.05$)

Buna karşın akut bruselloz grubunda *NLRP3* inflamazom geninin ifade edilme düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre 5 kat düşük bulunmuştur. Bu azalma istatistiki olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$) (Şekil 4.10).



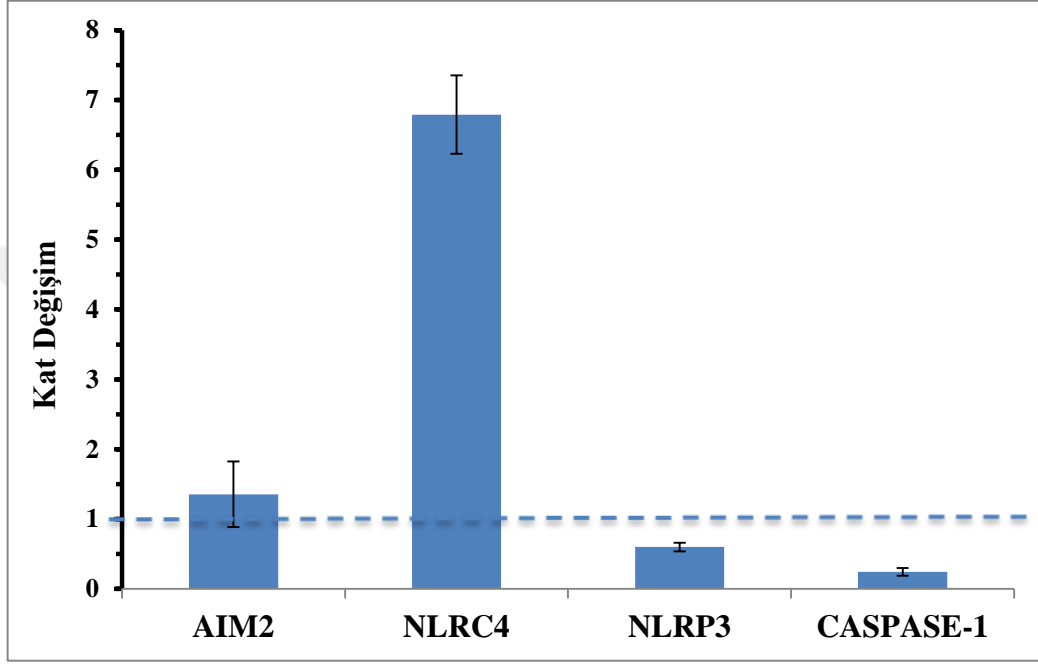
Şekil 4.10. Hasta ve kontrol grubundaki *NLRP3* gen ifadelerinin karşılaştırılması

Piroptoziste aktif duruma gelen *CASPASE-1* gen ifadesi sağlıklı gruba göre yüksek olmasına karşın, bu artış istatistiki olarak anlamlı bulunamamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Hasta ve kontrol grubundaki *CASPASE-1* gen ifadelerinin karşılaştırılması

Akut bruselloz varlığında *AIM2*, *NLRC4*, *NLRP3* ve *CASPASE-1* genlerine ait kat değişim grafiği aşağıda sunulmuştur. Bu grafiğe göre *AIM2* ve *NLRC4* genlerinin ifadelerinde bir artış gözlenmektedir. *NLRP3* ve *CASPASE-1* gen ifadelerinde ise bir artış gözlenmemiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *AIM2*, *NLRC4*, *NLRP3* ve *CASPASE-1* genlerinin kat değişim grafiği. Değerler ortalama kat değişimi \pm standart hata olarak gösterilmiştir. Üretici firmanın hesaplamalarında $1 >$ değerler anlamlı artış olarak kabul edilmiştir.

Sağlıklı kontrol ve akut bruselloz gruplarında *CASPASE-1*'in gen ifadesi ile *AIM2*, *NLRP3* ve *NLRC4* inflamazom gen ifadeleri arasında bir korelasyon olup olmadığı araştırılmıştır. Bu analize göre, sağlıklı kontrol grubunda *CASPASE-1*-*AIM2* ve *CASPASE-1*-*NLRP3* gen ifadelerinde korelasyon saptanmıştır ($p < 0.05$, $r = 0,79$ ve $r = 0,908$). *CASPASE-1*-*NLRC4* gen ifadeleri arasında bir korelasyon saptanmamıştır ($p > 0.05$, $r = 0,102$). Akut bruselloz grubunda ise *CASPASE-1*-*AIM2*, *CASPASE-1*-*NLRP3* ve *CASPASE-1*-*NLRC4* gen ifadeleri arasında bir korelasyon tespit edilmemiştir ($p > 0.05$).

5. TARTIŞMA

Bruselloz antibiyotik tedavisi sonrası iyileşme gösteren bir hastalık olmasına karşın; tedavi sonrası hastaların bir kısmında enfeksiyon tekrar gelişebilmektedir. Bu noktada akut bruselloz esnasında doğal immün yanıtın yeterli düzeyde aktive olup olmadığı günümüzde halen tartışılmaktadır. Bu tezde inflamatuvar immün yanıtın düzenlenmesinde rolü olan inflamazomların akut bruselloz esnasında ifade edilme düzeylerinin incelenmesi amaçlandı. Araştırmamızda hasta grubunda *AIM2* ve *NLRC4* gen ifadelerinin kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir ($p < 0,05$). *NLRP3* ve piroptosis hücre ölümünden sorumlu *CASPASE-1* gen ifadelerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda anlamlı bir artışın olmadığı gözlenmiştir ($p > 0,05$).

Brucella'nın konak immün sistem bileşenlerinden kaçmak veya mücadele etmek için birçok strateji sergilediğini kanıtlayan önemli miktarda kanıt vardır. Bu anlamda bakterinin virülansı önemli rol oynar. *Brucella*'ların hücrelerde düşük toksisite ve uyarıcı bir etki sağlamak için PAMP'ları azaltma, değişikliğe uğratma ve gizleme yoluyla ilgili birçok strateji geliştirdiği öne sürülmüştür (102).

Brucella konak hücre içindeyken kendisi için önem arz eden, bakterinin kendi DNA'sı gibi moleküller salabilir. Daha sonrasında konak immünesine katkı sağlayan pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini ve salınımını indükleyen *Brucella* DNA'sı sitosolik AIM2 inflamazom tarafından algılanır. AIM2 inflamazom çift zincirli DNA'yı tanıyan sitoplazik bir reseptördür (103). AIM2 inflamazom tarafından patojenlerdeki DNA'nın tanınması inflamazom aracılı konak immün yanıtlarının oluşmasına yol açar. Marko ve ark. (104) *Brucella* genomik DNA'sının AIM2 inflamazomu için bir ligand olduğu fikrini savunmuşlardır. AIM2 inflamazomunun makrofajlarda *Brucella* DNA'sı tarafından aktive edildiğini ve bunun da *CASPASE-1* aktivasyonuna ve IL-1 β salınımına yol açtığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, AIM2 knockout fareler *Brucella* enfeksiyonuna yabancıl tip kontrol farelerine göre daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Ancak, AIM2'nin *Brucella* enfeksiyonuna bağlı olarak DNA'yı nasıl algıladığı hala belirsizliğini korumaktadır (105).

Virulent *Mycobacteria* fagozom içindeyken fagozom-lizozom birleşmesini inhibe ederek ve lizozomun asidifikasyonunu engelleyerek hayatta kaldığı bilinmektedir. Son zamanlarda, miyeloid hücrelerdeki *M. tuberculosis*'in fagozomdan sitozole transloke

olduğu bildirilmiştir (106). Yang ve ark. (107) AIM2 inflamazomunun sitosolik DNA ile aktive olduğunu göz önüne aldıklarında, *M. bovis* virulent suş ile enfeksiyonu boyunca *Mycobacteria*'nın sitozole transloke olduğunu ve AIM2 inflamazomunun aktif duruma geldiğini göstermişlerdir.

Rathinam ve ark. (68) AIM2^{-/-} fare makrofajlarında yaptıkları çalışmada *F. tularensis* enfeksiyonu boyunca IL-18 üretiminin azaldığını, bakteriyel yükün arttığını ve mortalitenin hızlandığını kanıtlamışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmanın sonucunda *F. tularensis* enfeksiyonunda AIM2 inflamazomunun pro-inflamatuvar yanıtları uyarmada oldukça elzem bir kompleks olduğunu göstermişlerdir.

İnsanlarda *Brucella* enfeksiyonunda AIM2 inflamazomunun durumu şimdiye kadar araştırılmamıştır. Araştırmamızda AIM2 inflamazomunun *Brucella* enfeksiyonu ile birlikte aktif olduğunu gösterdik. Yani bakteri DNA'sı ile aktive olan AIM2, akut bruselloz hastalarında da aktivasyon göstermektedir.

NLRP3 inflamazomu tarafından başlatılan bir inflamatuvar yanıt, konak kaynaklı çeşitli tehlike sinyallerini tetikler. Marco ve ark. (104) NLRP3 knock-out fare makrofajlarında yaptıkları çalışmada IL-1β'nın daha düşük seviyelerde salgılandığını ve kontrol grubu farelerle karşılaştırıldığında *Brucella* enfeksiyonuna daha duyarlı olduğunu gösterilmiştir. Ancak bu duyarlılık ile ilgili mekanizma ayrıntılı olarak açıklanamamıştır.

NLRP3 inflamazomu tarafından başlatılan bir inflamatuvar yanıt, metabolik düzensizlik ve enfeksiyon gibi konakta çeşitli durumları tetiklemektedir. Bu son derece değişken stres sinyallerinin tek bir inflamazom tarafından nasıl tetiklendiği açıklığa kavuşturulamamıştır. NLRP3 aktivasyonu için önemli unsurlardan biri de ROS'tur. Marco ve ark. (104) yaptıkları çalışmada *Brucella*'nın mitokondriyal ROS'u indüklediği ve bu sinyal bakteriyel enfeksiyon boyunca inflamazom aktivasyonu ve IL-1β salgılanmasında gerekli olduğu saptamışlardır (104). Çalışmamızda NLRP3 gen ifadesini hasta grubu ile kontrol grubunda karşılaştırdığımızda anlamlı olmayan bir artış olduğu tespit edildi. Bu nedenle NLRP3 inflamazomunun aktivasyon mekanizmasıyla ilgili karanlıkta bulunan noktaların aydınlatılması için insanlarda *Brucella* enfeksiyonu ile ilgili daha fazla çalışma yapılabilir.

Petrielli ve ark. (108) K⁺ akışının NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu tetiklediğini göstermişlerdir. Bu bilgiden yola çıkan Yang ve ark. (109) virulent *M.*

bovis suşunu kullanarak yaptıkları hücre kültüründe, yüksek K⁺ akışının IL-1 β ve CASPASE-1 olgunlaşmasını ve salınımını engellediğini göstermişlerdir.

Flajellar filamentin monomerik alt ünitesi olan bakteriyel flajellin bir PAMP olarak kabul edilmektedir (110). Bakteriyel virülans ile ilişkili sekresyon sistemlerinde bulunan makrofaj sitoplazmasına enjekte edilen flajellin NLRC4 tarafından algılanır (111, 112). NLRC4 inflamazomundaki CASPASE-1'in aktivasyonu; biyolojik olarak aktif proinflamatuvar sitokinler olan IL-1 β ve IL-18'in olgunlaşmasına ve salınımına yol açar (113). Ayrıca, bu inflamazom piroptosis olarak bilinen hücre ölümünü tetikleyebilir (114). Matthieu ve ark. (23) sitozolik PRR'ler tarafından flajellinin tanınması ile *Brucella* ve konak arasında immunolojik bir ayrılığa yol açan bir yanıtın başlatıldığını göstermişlerdir. Flajellin eksik mutantlarda doğal ve kazanılmış bağışıklık, *Brucella* enfeksiyonunun kamufle edilmesinde veya kronikleşmesinde önemli bir etken olduğunu gösterilmiştir. Bu yüzden bruselloz bağlamında flajellin "konak koruyucu bir faktör" olarak kabul edilir (115).

B. abortus bakteriyel replikasyonda önemli bir rol oynayan virB, T4SS'yi ifade eder (116). Bakteriler, genetik değişim için T4SS kullanırlar ve ökaryotik hedef hücrelere efektör molekülleri ulaştırırlar. Marko ve ark. (104) T4SS eksik *Brucella* mutant suşlarıyla yaptığı çalışmada IL-1 β sekresyonunun kontrol farelerine oranla daha düşük oranla sekresyonunu indüklediğini göstermişlerdir. Bu çalışmayla birlikte fare makrofajlarında NLRC4'ün dolaylı yoldan T4SS vasıtasıyla doğal immün yanıtı tetiklediğini söyleyebiliriz. İnsanlarda *Brucella* enfeksiyonu varlığında NLRC4 inflamazomunun rolüne ilişkin bir çalışma şimdiye kadar yapılmamıştır. Çalışmamızda insanlarda *Brucella* enfeksiyonu ile birlikte *NLRC4* iflamazom geninin mRNA ifadesinin arttığı ve doğal immün yanıtın oluşturulduğu tespit edilmiştir. Bu bilgi daha sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Jianning ve ark. (70) insan makrofajlarındaki *L. pneumophila*'nın NLRC4 inflamazom aktivasyonunu tetiklediğini göstermişlerdir. İnsan makrofajlarında bakteri flajellini için reseptör olan NLRC4 inflamazomunun yokluğunda *L. pneumophila* ile indüklenmiş doğal immün yanıtın oluşumunda DNA'ya duyarlı AIM2 inflamazomunun sorumlu olduğunu göstermişlerdir. *Legionella*'daki AIM2 inflamazomunun aktivasyonu fare makrofajlarında da oluşmaktadır. Fakat AIM2 inflamazomu ile NLRC4 inflamazomu karşılaştırıldığında flajellin tarafından aktive olan NLRC4 inflamazomunun daha baskın bir şekilde aktive olduğu gösterilmiştir. İnsan ve fare

inflamazom sistemlerindeki bu farklılık, U937 hücrelerinde gözlenen *L. pneumophila* hücre içi replikasyonunun serbestliği ile açıklanmaktadır. Ayrıca bu çalışmada makrofaj sitozolüne *L. pneumophila* DNA'sının sızdığını kanıtlamışlardır. Bunun dışında daha öncesinde tip I IFN yanıtının indüklenmesiyle de açıklanabilir (117-119). AIM2 inflamazomunun salınımı ve tip I IFN yanıtını tetikleyen bakteriyel DNA'nın salınımı *F. tularensis* ve *L. monocytogenes* gibi bakterilerde de gözlenmektedir (120, 121). Bu yüzden intrasellüler bakteriler tarafından salınan DNA konak immün sistemi için bir PAMP olarak algılanır. Bu çalışmada patojen kaynaklı DNA, özellikle de mitokondriyal DNA doğal immün yanıtın uyarılmasına katkı sağladığını göstermişlerdir (70).

İnflamazom bağımlı CASPASE-1 aktivasyonu piroptosis olarak bilinen hücre ölümü ile sonuçlanabilir (114). Piroptosis hücre içi patojenler ile enfeksiyona bağlı olarak çok sık olarak ortaya çıkmaktadır ve antimikrobiyal yanıtın bir parçası olma olasılığı muhtemeldir (91, 122, 123). Aktif CASPASE-1 çeşitli mikrobiyal enfeksiyonları kontrol altında tutmak için konağa imkan sağlar. Bu yüzden bu patojenlerin CASPASE-1 aktivasyonunu kısıtlamak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiş olması şaşırtıcı değildir. Marco ve ark. *B. abortus* ile indüklenen CASPASE-1 aktivasyonunun piroptozise yol açmadığını göstermişlerdir (104). Şimdiye kadar insanlarda *Brucella* enfeksiyonunda CASPASE-1'in rolüne ilişkin bir çalışma yapılmamıştır. Bu yüzden bu veriler insanlara uyarlamakta imkansızlaşmıştır. Araştırmamızda *Brucella* enfeksiyonu ile CASPASE-1 gen ifadesinde anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Bu yüzden insan makrofajlarının *Brucella* enfeksiyonu ile CASPASE-1'in yol açtığı piroptosis olarak bilinen hücre ölümüne gitmediği belirlenmiştir. Bu sonuç ile birlikte *Brucella*'nın hücre içindeki yaşam savaşını kazandığı ve hayatta kalmaya devam ettiği düşünülmektedir .

Chen ve ark. (124) zayıflatılmış *Brucella suis* ile enfekte olmuş makrofajlarda yaptıkları araştırmada CASPASE-1 aracılı hücre ölümünün değilde CASPASE-2 aracılı hücre ölümünün indüklendiğini göstermişlerdir. *Brucella* piroptozisi önlemek için bir strateji geliştirmiştir. Bu nedenle *Brucella* hücre içi replikasyonunu sağlar. Ancak *Brucella* bakterisinin hangi mekanizma ile replikasyonuna devam ettiği şu ana kadar aydınlatılamamıştır. *Mycobacterium* ve *Franciscella* CASPASE-1 aktivasyonunun inhibe edebilmek için çeşitli mekanizmalara sahiptirler. Fakat bu bakterilerin in vivo zayıflatılmış mutantları CASPASE-1 aktivasyonunu kontrol edemez. Bu bulgular aktif

CASPASE-1 seviyesinin arttığı ve piroptozisin bakteriyel replikasyonu sınırladığı düşüncesi ile tutarlıdır (125, 126).

CASPASE-1 ve ASC; *Franciscella* (127), *S. pneumoniae* (128), ve *S. typhimurium* (129, 130) gibi çoğu patojene karşı savunmada doğal immünitede konak için önemlidir. Marco ve ark. ASC, CASPASE-1, AIM2 ve NLRP3 gibi inflamazom ve inflamazom bileşenlerinin eksik olduğu farelerin *B. abortus* enfeksiyonuna daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca *Brucella* enfeksiyonuna karşı gelişmiş bu duyarlılık *CASPASE-1*, *ASC*, *AIM2* ve *NLRP3* knock-out farelerde, IL-1 β üretimi ve muhtemelen IL-18 üretiminde azalmaya neden olmaktadır (104).

Genetik çalışmalarda ASC'nin; NLRC4, NLRP3 ve AIM2 inflamazomu için bir adaptör protein olduğu gösterilmiştir. ASC, CASPASE-1 aktivasyonu ve IL-1 β üretimi için mikrobiyal kaynaklı sinyallerle işbirliği yaptığı gösterilmiştir (131). Marco ve ark. westerblot analizleri, biyokimyasal analizler ve histopatolojik bulgular ışığında *B. abortus* ile enfekte edilmiş makrofajlardaki CASPASE-1 aktivasyonunun ve IL-1 β sekresyonunun mekanizmasını araştırmışlardır. Bu çalışmada ASC'nin *Brucella* enfeksiyonu boyunca CASPASE-1'in aktivasyonunu; ayrıca IL-1 β olgunlaşmasını ve salınımını indüklemeye gerekli olduğunu göstermişlerdir (104).

Sonuç olarak; inflamazomlar; *Brucella* enfeksiyonu ile birlikte immün sistemin bir parçası olarak aktifleşmektedir. *Brucella* enfeksiyonu sonrasında insanlarda inflamazomların aktivasyonunu belirten bir çalışma şimdiye kadar yapılmamıştır. Bu yüzden elde edilen her bulgu bu mekanizmanın aydınlatılabilmesi için önemli olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akut bruselloz sırasında doğal immün yanıtın etkin düzeyde aktive olup olmadığını araştırdığımız bu çalışmamızda, doğal immün yanıtın etkinliğini belirlemek amacıyla akut bruselloz hastalarından ve sağlıklı bireylerden elde ettiğimiz periferik kanlardan inflamasyonda rolü olan *AIM2*, *NLRP3* ve *NLRC4* inflamazom genlerinin ve piroptozise yön veren *CASPASE-1* geninin ifade edilme düzeyleri araştırılmıştır.

Sonuç olarak bu genlerden *AIM2* ve *NLRC4* genlerinin ifadesinin artması, akut brusellozda *AIM2* ve *NLRC4* inflamazomlarının etkin bir rol oynayabileceğini bize gösterdi. Çalışmamızda akut bruselloz esnasında *NLRP3* geninin ifadesinde anlamlı bir değişiklik olmadığını gördük. Bu durum bize *NLRP3* inflamazomunun akut brusellozda etkinliğinin olmayabileceğini düşündürdü. Ayrıca çalışmamızda *CASPASE-1* gen ifadesinin değişmemesi akut brusellozda piroptozis olarak bilinen hücre ölüm yolağının etkin olmayabileceğini bize gösterdi. Fakat akut bruselloz sırasında doğal immün yanıt oluştuğu bilinmektedir. Doğal ümmün yanıt oluşumu inflamazom kaynaklı olmayıp farklı hücre yollarından kaynaklanmış olabilir. Bu yolağa örnek olarak bir sitokin olan Tümör Nekroz Faktör- α verilebilir.

Bulduğumuz veriler ışığında akut brusellozun tedavisinde *AIM2* ve *NLRC4* genlerinin ifadesinin artırılması doğal immün yanıtın etkinliğini artırarak iyileşme sürecine katkıda bulunabilir. Başka bir önemli noktada akut bruselloz esnasında TNF- α , TNF- γ ve IL-1 β gibi sitokinlerin önemli rol oynadığıdır. Bu bağlamda akut brusellozun tedavisiyle ilgili yapılacak çalışmalarda bu durum göz önünde bulundurulmalıdır.

Patojenlerle ilişkili diğer hastalıklarda doğal immün yanıtta hangi inflamazomların rol oynadığı aydınlatılması gereken başka bir noktadır. Böylece inflamazomların doğal immün yanıt mekanizmasındaki rolleri daha net bir şekilde anlaşılacaktır ve bu yolların tam olarak bilinmesi yeni tedavi yöntemleri için bizlere ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Murray PR, Baron EJ, Microbiology ASf. Manual of clinical microbiology: ASM Press 2003.
2. Tolomeo M, Di Carlo P, Abbadessa V, Titone L, Miceli S, Barbusca E, et al. Monocyte and lymphocyte apoptosis resistance in acute and chronic brucellosis and its possible implications in clinical management. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2003 36(12): 1533-8.
3. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi: Nobel Tıp Kitabevleri 2008.
4. Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, et al. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *The Journal of cell biology* 2011 195(6): 931-42.
5. Latz E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Current opinion in immunology* 2010 22 (1): 28-33.
6. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature* 2012 481(7381): 278-86.
7. Young EJ. Human brucellosis. *Reviews of infectious diseases* 1983 5(5): 821-42.
8. Centers for Disease C, Prevention. Summary of notifiable diseases--United States, 2001. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 2003 50(53): i-xxiv, 1-108.
9. Yagupsky P, Baron EJ. Laboratory exposures to *Brucella* and implications for bioterrorism. *Emerging infectious diseases* 2005 11(8): 1180-5.
10. Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian medical journal* 2010 51(4): 296-305.
11. Murray PR, Microbiology ASf. Manual of Clinical Microbiology: ASM Press 1999.
12. Capasso L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *The Journal of infection* 2002 45(2): 122-7.
13. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi: Nobel Tıp 2002.
14. GL. M, Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, EJ. Y. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed: Elsevier Health Sciences 2000.
15. Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D. Önemli ve sorunlu Gram-Negatif bakteri enfeksiyonları: Bilimsel Tıp Yayınevi 2004.
16. Çelebi S. Brusellozun epidemiyolojisi. *Ankem derg.* 2003 17(3): 340-3.
17. Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*: Springer 2001.
18. Beaman L, Beaman BL. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Annual review of microbiology* 1984 38: 27-48.
19. Verger J GF, Grimont PAD. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann Inst Pasteur Microbial* 1987 138: 235-8.
20. Osterman B, Moriyon I. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. . *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2006 56: 1173-5.
21. Witter J, O'Meara D, Davis J. Brucellosis. In *Infectious Diseases of Wild Mammals*. Iowa State University Press 1970 249-55.

22. Disarno A, Izzi R, Sandulli S, Santagata N. *Brucella melitensis* Isolation From Fresh Sheep Cheese-Etiology and Epidemiology Industrie Alimentary. *J Clin Microbiol* 1992 31; 3.
23. Terwagne M, Ferooz J, Rolan HG, Sun YH, Atluri V, Xavier MN, et al. Innate immune recognition of flagellin limits systemic persistence of *Brucella*. *Cellular microbiology* 2013 15(6): 942-60.
24. Smith L, Ficht T. Pathogenesis of *Brucella*. *CritRevMicrobiol* 1990 17(3): 209-30.
25. Bundle D, Cherwonogrodsky J, Gidney MAJ., Meikle PJ., Perry MB., T. P. Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect Immun* 1989 57(9): 2829-36.
26. Ustaçelebi Ş, Günal M. Temel ve klinik mikrobiyoloji: Güneş kitabevi 1999.
27. Young EJ, Corbel MJ. Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects: Taylor & Francis 1989.
28. WJ. BM. Comparasion of various media fort he growth and isolation of *Brucella*. *ResVetSci* 1960 1(1): 47-52.
29. Yılmaz S, Z. K. 1971-81 yılları kapsayan süre içerisinde sığır ve koyunlarda yapılan *Brucella* jerm izolasyonları. *Etlik Vet MikEnstDerg.* 1981 1,2(3): 29-33.
30. Conde-Alvarez R, Arce-Gorvel V, Iriarte M, Mancek-Keber M, Barquero-Calvo E, Palacios-Chaves L, et al. The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition. *PLoS pathogens* 2012 8(5): e1002675.
31. Parent MA, Goenka R, Murphy E, Levier K, Carreiro N, Golding B, et al. *Brucella abortus* bacA mutant induces greater pro-inflammatory cytokines than the wild-type parent strain. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2007 9(1): 55-62.
32. de Jong MF, Tsolis RM. Brucellosis and type IV secretion. *Future microbiology* 2012 7(1): 47-58.
33. Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of experimental medicine* 2003 198(4): 545-56.
34. Cengiz M. Bruselloz: 76 olgunun değerlendirilmesi 2007.
35. Yüce A, Çavuş SA. Türkiye’de Bruselloz: Genel Bakış. *Klinik Dergisi* 2006 19: 87-97.
36. Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M., Leloğlu N. *Brucella* İnfeksiyonları. p.110-124. *Listeria İnfeksiyonları*. p.147-155. Ankara: Medisan Yayınevi 1997.
37. Magnani DM, Lyons ET, Forde TS, Shekhani MT, Adarichev VA, Splitter GA. Osteoarticular tissue infection and development of skeletal pathology in murine brucellosis. *Disease models & mechanisms* 2013 6(3): 811-8.
38. Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esenal Ö, Paracıkoğlu J, et al. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar) İlke-Emek yayınları 2006.
39. Solis Garcia del Pozo J, Solera J. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials in the treatment of human brucellosis. *PloS one* 2012 7(2): e32090.
40. Arnow PM, Smaron M, Ormiste V. Brucellosis in a group of travelers to Spain. *Jama* 1984 251(4): 505-7.
41. Ariza J, Corredoira J, Pallares R, Viladrich PF, Rufi G, Pujol M, et al. Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 1995 20(5): 1241-9.

42. Sancak YC, Boynukara B, Yardımcı H. Van Otlu Peynirlerinde *Brucella*'ların Varlığı ve Dayanma Süresi Üzerinde Bir Araştırma. *Journal of Konya Animal diseases Research Institute* 1983 4(1): 1-3.
43. Buzgan T, Karahocagil MK, Irmak H, Baran AI, Karsen H, Evirgen O, et al. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 2010 14(6): e469-78.
44. Elfaki MG, Alaidan AA, Al-Hokail AA. Host response to *Brucella* infection: review and future perspective. *Journal of infection in developing countries* 2015 9(7): 697-701.
45. Ariza J, Bosch J, Gudiol F, Linares J, Viladrich PF, Martin R. Relevance of in vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* to relapse rate in human brucellosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1986 30(6): 958-60.
46. Murray PR, Baron EJ. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington, D.C.: ASM Press 2007.
47. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *International journal of antimicrobial agents* 2010 36 Suppl 1: S12-7.
48. Nielsen K, Yu WL. Serological diagnosis of brucellosis. *Prilozi / Makedonska akademija na naukite i umetnostite, Oddelenie za bioloski i medicinski nauki = Contributions / Macedonian Academy of Sciences and Arts, Section of Biological and Medical Sciences* 2010 31(1): 65-89.
49. Al Dahouk S, Nockler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert review of anti-infective therapy* 2011 9(7): 833-45.
50. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier 2007 viii, 566 p. p.
51. Male D, Brostoff, J., Roth, B. D., Roitt, M. I. Immunology. 8th ed: Elsevier 2013.
52. Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nature immunology* 2012 13(4): 325-32.
53. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* 2011 30(1): 16-34.
54. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010 140(6): 805-20.
55. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology* 2004 25(6): 280-8.
56. Dornand J, Gross A, Lafont V, Liautard J, Oliaro J, Liautard JP. The innate immune response against *Brucella* in humans. *Veterinary microbiology* 2002 90(1-4): 383-94.
57. Zwerdling A, Delpino MV, Pasquevich KA, Barrionuevo P, Cassataro J, Garcia Samartino C, et al. *Brucella abortus* activates human neutrophils. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2009 11(6-7): 689-97.
58. Ko J, Gendron-Fitzpatrick A, Splitter GA. Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis. *Journal of immunology* 2002 168(5): 2433-40.
59. Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier 2009 viii, 312 p. p.
60. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology* 2011 29: 707-35.

61. Dell'Oste V, Gatti D, Giorgio AG, Gariglio M, Landolfo S, De Andrea M. The interferon-inducible DNA-sensor protein IFI16: a key player in the antiviral response. *The new microbiologica* 2015 38(1): 5-20.
62. Diner BA, Li T, Greco TM, Crow MS, Fuesler JA, Wang J, et al. The functional interactome of PYHIN immune regulators reveals IFIX is a sensor of viral DNA. *Molecular systems biology* 2015 11(1): 787.
63. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 2009 458(7237): 509-13.
64. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009 458(7237): 514-8.
65. Jin T, Perry A, Jiang J, Smith P, Curry JA, Unterholzner L, et al. Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity* 2012 36(4): 561-71.
66. Kawane K, Ohtani M, Miwa K, Kizawa T, Kanbara Y, Yoshioka Y, et al. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* 2006 443(7114): 998-1002.
67. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Juliana C, Solorzano L, Kang S, Wu J, et al. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nature immunology* 2010 11(5): 385-93.
68. Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nature immunology* 2010 11(5): 395-402.
69. Kim S, Bauernfeind F, Ablasser A, Hartmann G, Fitzgerald KA, Latz E, et al. *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *European journal of immunology* 2010 40(6): 1545-51.
70. Ge J, Gong YN, Xu Y, Shao F. Preventing bacterial DNA release and absent in melanoma 2 inflammasome activation by a *Legionella* effector functioning in membrane trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012 109(16): 6193-8.
71. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 2004 20(3): 319-25.
72. Vladimer GI, Marty-Roix R, Ghosh S, Weng D, Lien E. Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. *Current opinion in microbiology* 2013 16(1): 23-31.
73. Rathinam VA, Vanaja SK, Waggoner L, Sokolovska A, Becker C, Stuart LM, et al. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell* 2012 150(3): 606-19.
74. Ritter M, Gross O, Kays S, Ruland J, Nimmerjahn F, Saijo S, et al. *Schistosoma mansoni* triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010 107(47): 20459-64.
75. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, et al. Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011 127(3): 806-14 e1-4.

76. Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlar T, et al. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2011 68(5): 765-83.
77. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006 440(7081): 237-41.
78. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature immunology* 2008 9(8): 857-65.
79. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010 464(7293): 1357-61.
80. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology* 2008 9(8): 847-56.
81. Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010 107(45): 19449-54.
82. Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Nunez G, Hornung V. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *Journal of immunology* 2011 187(2): 613-7.
83. Kim HK, Andreazza AC, Elmi N, Chen W, Young LT. Nod-like receptor pyrin containing 3 (NLRP3) in the post-mortem frontal cortex from patients with bipolar disorder: A potential mediator between mitochondria and immune-activation. *Journal of psychiatric research* 2015 72: 43-50.
84. Jang Y, Lee AY, Jeong SH, Park KH, Paik MK, Cho NJ, et al. Chlorpyrifos induces NLRP3 inflammasome and pyroptosis/apoptosis via mitochondrial oxidative stress in human keratinocyte HaCaT cells. *Toxicology* 2015 338:37-46.
85. Shao BZ, Xu ZQ, Han BZ, Su DF, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Frontiers in pharmacology* 2015 6: 262.
86. Poyet JL, Srinivasula SM, Tnani M, Razmara M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *The Journal of biological chemistry* 2001 276(30): 28309-13.
87. Aachoui Y, Leaf IA, Hagar JA, Fontana MF, Campos CG, Zak DE, et al. Caspase-11 protects against bacteria that escape the vacuole. *Science* 2013 339(6122): 975-8.
88. Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell host & microbe* 2010 8(6): 471-83.
89. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 2004 430(6996): 213-8.
90. Zamboni DS, Kobayashi KS, Kohlsdorf T, Ogura Y, Long EM, Vance RE, et al. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection. *Nature immunology* 2006 7(3): 318-25.
91. Suzuki T, Franchi L, Toma C, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, et al. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-infected macrophages. *PLoS pathogens* 2007 3(8): e111.

92. Miao EA, Ernst RK, Dors M, Mao DP, Aderem A. Pseudomonas aeruginosa activates caspase 1 through Ipaf. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008 105(7): 2562-7.
93. Gong YN, Shao F. Sensing bacterial infections by NAIP receptors in NLRC4 inflammasome activation. *Protein & cell* 2012 3(2): 98-105.
94. Buttner D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 2012 76(2): 262-310.
95. Lage SL, Buzzo CL, Amaral EP, Matteucci KC, Massis LM, Icimoto MY, et al. Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013 110(35): E3321-30.
96. Fantuzzi G, Puren AJ, Harding MW, Livingston DJ, Dinarello CA. Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice. *Blood* 1998 91(6): 2118-25.
97. McIntire CR, Yeretssian G, Saleh M. Inflammasomes in infection and inflammation. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2009 14(4): 522-35.
98. Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological reviews* 2011 243(1): 206-14.
99. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010 140(6): 821-32.
100. von Moltke J, Ayres JS, Kofoed EM, Chavarria-Smith J, Vance RE. Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annual review of immunology* 2013 31: 73-106.
101. Sansonetti PJ, Phalipon A, Arondel J, Thirumalai K, Banerjee S, Akira S, et al. Caspase-1 activation of IL-1beta and IL-18 are essential for Shigella flexneri-induced inflammation. *Immunity* 2000 12(5): 581-90.
102. Campos PC, Gomes MT, Guimaraes G, Costa Franco MM, Marim FM, Oliveira SC. *Brucella abortus* DNA is a major bacterial agonist to activate the host innate immune system. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2014 16(12): 979-84.
103. Sharma S, Fitzgerald KA. Innate immune sensing of DNA. *PLoS pathogens* 2011 7(4): e1001310.
104. Gomes MT, Campos PC, Oliveira FS, Corsetti PP, Bortoluci KR, Cunha LD, et al. Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to *Brucella abortus* infection. *Journal of immunology* 2013 190(7): 3629-38.
105. de Almeida LA, Carvalho NB, Oliveira FS, Lacerda TL, Vasconcelos AC, Nogueira L, et al. MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-mediated IFN-beta induction in response to *Brucella abortus* infection. *PloS one* 2011 6(8): e23135.
106. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, et al. M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 2007 129(7): 1287-98.
107. Yang Y, Zhou X, Kouadir M, Shi F, Ding T, Liu C, et al. the AIM2 inflammasome is involved in macrophage activation during infection with virulent Mycobacterium bovis strain. *The Journal of infectious diseases* 2013 208(11): 1849-58.

108. Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell death and differentiation* 2007 14(9): 1583-9.
109. Zhou Y, Zhao D, Yue R, Khan SH, Shah SZ, Yin X, et al. Inflammasomes-dependent regulation of IL-1beta secretion induced by the virulent *Mycobacterium bovis* Beijing strain in THP-1 macrophages. *Antonie van Leeuwenhoek* 2015 108(1): 163-71.
110. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001 410(6832): 1099-103.
111. Kofoed EM, Vance RE. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature* 2011 477(7366):592-5.
112. Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H, et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 2011 477(7366): 596-600.
113. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA. Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends in immunology* 2011 32(3): 110-6.
114. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews Microbiology* 2009 7(2): 99-109.
115. Shames SR, Finlay BB. Breaking the stereotype: virulence factor-mediated protection of host cells in bacterial pathogenesis. *PLoS pathogens* 2010 6(9): e1001057.
116. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature medicine* 2011 17(2): 179-88.
117. Opitz B, Vinzing M, van Laak V, Schmeck B, Heine G, Gunther S, et al. *Legionella pneumophila* induces IFNbeta in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF3, which also control bacterial replication. *The Journal of biological chemistry* 2006 281(47): 36173-9.
118. Stetson DB, Medzhitov R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 2006 24(1): 93-103.
119. Monroe KM, McWhirter SM, Vance RE. Identification of host cytosolic sensors and bacterial factors regulating the type I interferon response to *Legionella pneumophila*. *PLoS pathogens* 2009 5(11): e1000665.
120. Jones JW, Kayagaki N, Broz P, Henry T, Newton K, O'Rourke K, et al. Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010 107(21): 9771-6.
121. Sauer JD, Witte CE, Zemansky J, Hanson B, Lauer P, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* triggers AIM2-mediated pyroptosis upon infrequent bacteriolysis in the macrophage cytosol. *Cell host & microbe* 2010 7(5): 412-9.
122. Case CL, Shin S, Roy CR. Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 2009 77(5): 1981-91.
123. Fink SL, Bergsbaken T, Cookson BT. Anthrax lethal toxin and *Salmonella* elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008 105(11): 4312-7.

124. Chen F, Ding X, Ding Y, Xiang Z, Li X, Ghosh D, et al. Proinflammatory caspase-2-mediated macrophage cell death induced by a rough attenuated *Brucella suis* strain. *Infect Immun* 2011 79(6): 2460-9.
125. Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, Springer B, et al. Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. *Cell host & microbe* 2008 3(4): 224-32.
126. Weiss DS, Brotcke A, Henry T, Margolis JJ, Chan K, Monack DM. In vivo negative selection screen identifies genes required for Francisella virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007 104(14): 6037-42.
127. Mariathasan S, Weiss DS, Dixit VM, Monack DM. Innate immunity against Francisella tularensis is dependent on the ASC/caspase-1 axis. *The Journal of experimental medicine* 2005 202(8): 1043-9.
128. Fang R, Tsuchiya K, Kawamura I, Shen Y, Hara H, Sakai S, et al. Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to Streptococcus pneumoniae infection. *Journal of immunology* 2011 187(9): 4890-9.
129. Lara-Tejero M, Sutterwala FS, Ogura Y, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, et al. Role of the caspase-1 inflammasome in Salmonella typhimurium pathogenesis. *The Journal of experimental medicine* 2006 203(6): 1407-12.
130. Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM, Monack DM. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. *The Journal of experimental medicine* 2010 207(8): 1745-55.
131. Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Nunez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nature immunology* 2009 10(3): 241-7.

EKLER

EK-1: ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gamze KARACA

Doğum Tarihi : 21.06.1987

Doğum Yeri : Malatya

Uyruk : T.C.

Eğitim Bilgileri:

2012- ...Devam ediyor : İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Malatya),
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Tezli Yüksek Lisans

2010-2011 : İnönü Üniversitesi (Malatya) Pedagojik Formasyon

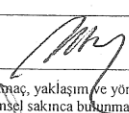
2007-2011 : İnönü Üniversitesi (Malatya) Biyoloji Bölümü Lisans

EK-2: ETİK KURUL KARARI

MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	AKUT BRUSELLOZDA BAZI İNFLAMAZOM GENLERİNİN İFADE EDİLME DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	2013/74			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Başak KAYHAN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	MALATYA			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
	FAZ 4	<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BİYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:	Tarih: 13.06.2013		
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekeceği amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			


Çiğdem GÖKÇEK
Fakülte Sekreter V.

Sayfa 1

MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Hamza KARABİBER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Hamza KARABİBER	Çocuk Sağlığı ve Hast.	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Metin GENÇ	Halk Sağlığı	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Saim YOLOĞLU	Biyoistatistik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Türkan TOĞAL	Anesteziyoloji ve Rea.	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ahmet KARADAĞ	Çocuk Sağlığı ve Hast.	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Alaadin POLAT	Fizyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. H.Birgöl CUMURCU	Psikiyatri	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yusuf YAKUPOĞULLARI	Tıbbi Mikrobiyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARATAŞ	Tıp Tarihi ve Etik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Neslihan ŞİMŞEK	Dış Hekimliği	İnönü Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Seda TAŞDEMİR	Tıbbi Farmakoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Ömer Murat AYDIN	Nükleer Tıp Uzmanı	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Hasan KONAN	Sivil Üye	Zaloğlu Ltd. Şti.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

ASLI GİBİDİR

Güngör GÖKÇEK
Fakülte Sekreteri V.

Sayfa 2

EK-3: HASTA BİLGİLENDİRME FORMU

AKUT BRUSELLOZDA BAZI İNFLAMAZOM GENLERİNİN İFADE EDİLME DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmanın amacı doktorum tarafından bana, hastalığım olan bruselloza neden olan mikrobun benim bağışıklık sistemine olan etkilerin araştırılması olduğunu söyledi. Araştırma sonuçlarının hastalığım olan bruselloz patogenezinin ve oluşturduğu etkilerin sebeplerinin daha iyi araştırılmasına katkıda bulunabileceği belirtildi.

Bana, araştırma sırasında hastalığıma neden olan mikropla ilgili kan alınacağı, alınan bu kandan araştırmaya yönelik laboratuvar testleri yapılacağı anlatıldı.

Doktorum bana, söz konusu çalışma esnasında uygulanacak olan işlemlerin hiçbir risk taşımadığını söyledi.

Bu çalışma ile hastalığımin tedavisinde değişiklik yapılmayacağı ve bu çalışmadan çıkarılan sonuçların başka insanların yararına kullanılabileceğinin bilincindeyim. Hastalığımin seyri doktorum tarafından sürekli olarak takip edilecek ve ortaya çıkabilecek komplikasyonlar tedavi edilecektir.

Doktorum bu çalışmanın İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından, bu Helsinki Deklerasyonu'nda belirtilen maddelere göre ahlaki, vicdani ve tıbbi kurallara uygun olduğu onaylanmış olduğunu belirtmiştir.

Çalışmanın yürütülmesinden sorumlu doktor veya destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihtimalim nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabileceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütülmesi, olası yan etkiler veya bir hasta olarak haklarım konusunda kafamda sorular belirlediğinde doktorum (Tel: 0 422 3410660-4404) ile bağlantı kurmamın yeterli olacağı bilincindeyim.

Çalışma süresince tutulan bütün kayıtlar, benden alınan kan örnekleri üzerinde hastalığımla ilgili testler yapılabilir. Üreyen mikrop, dosya bilgileri, bu çalışmadan elde edilen bilgiler ve çalışmanın sonuçları toplantılar veya bilimsel yayınlarda sunulabilir, ancak bu durumda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

Sorumlu doktora haber vermek kaydıyla, bu çalışmadan istediğim an çıkabileceğimin bilincindeyim. Bu çalışmaya katılmayı reddetmem yada sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediğimin ve bu durumun şimdi ya da gelecekte ihtiyacım olan tıbbi bakımı hiçbir şekilde etkilemeyeceğinin bilincindeyim.

Bu olur formunu imzalamadan önce yukarıdaki bilgileri okudum veya bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı bana açıklandı. Bana aklıma gelen bütün soruları sorma fırsatı tanındı ve sorularıma tatminkar cevaplar aldım. Bu çalışmaya katılamayacağım ya da katıldıktan sonra vazgeçtiğim takdirde hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu çalışmada yer almayı gönüllü olarak kabul ediyorum.

Bu bildirimli olur sözleşmesinin imzalı bir örneğini aldım.

Hastanın Adı ve Soyadı
(Veli veya vasisinin)

İmzası

Tarih

Sorumlu Doktorun Adı ve Soyadı

İmzası

Tarih

Tanığın adı ve soyadı

İmzası

Tarih