

**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI**

***BRUCELLA MELİTENSİS* ENFEKTE MAKROFAJLARDA  
CİSPLATİN TEDAVİSİNİN KONAK SAVUNMA SİSTEMİNİ  
GÜÇLENDİRİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Eda TOSYALI**

**Danışman**

**Doç. Dr. Suat ERDOĞAN**

**HATAY-2008**

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

***BRUCELLA MELİTENSİS* ENFEKTE MAKROFAJLARDA  
CİSPLATİN TEDAVİSİNİN KONAK SAVUNMA SİSTEMİNİ  
GÜÇLENDİRİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eda TOSYALI

Danışman

Doç. Dr. Suat ERDOĞAN

HATAY-2008

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	I
<b>TABLO LİSTESİ</b>	II
<b>KISALTMALAR</b>	III
<b>1. ÖZET</b>	V
<b>2. ABSTRACT</b>	VII
<b>3. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER</b>	1
3.1. Etiyoloji	2
3.2. Epidemiyoloji	3
3.3. Patogenez	3
3.4. Brusellozda İmmunite	7
3.5. İnsan Brusellozunda Tedavi Uygulamaları	7
3.6. Cisplatin	8
3.7. Serbest Radikaller, Antioksidanlar ve Bruselloz	10
3.7.1. Serbest radikaller	10
3.7.1.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)	11
3.7.1.2. Hipokloröz asit (HOCl)	12
3.7.1.3. Lipit peroksidasyonu	12
3.7.1.4. Nitrik oksit (NO)	13
3.7.1.5. Ksantin oksidaz enzimi (XO)	15
3.7.2. Brusellozda antioksidan sistem	15
3.8. Brucella Enfeksiyonlarında Sitokinlerin Rolü	17
<b>4. MATERYAL VE METOT</b>	18
4.1. Hücre Kültürü	18
4.2. Hücre Pasajı	18

4.3. Makrofaj Dönüşümü	18
4.4. <i>Brucella</i> Enfeksiyonu Oluşturma	19
4.5. Cisplatin Uygulaması	19
4.6. Homojenat Hazırlama	20
4.7. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	20
4.8. Tripan Mavisi ile Canlı-Ölü Değerlendirmesi	21
4.9. MTT Viabilite Testi	21
4.10. Malondialdehit (MDA) Analizi	22
4.11. Nitrik Oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi	22
4.12. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini	22
4.13. Glutasyon (GSH) Analizi	23
4.14. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini	23
4.15. Ksantin Oksidaz (XO) Aktivitesi Tayini	23
4.16. Myeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Tayini	24
4.17. TNF- $\alpha$ ve IL-12 Düzeyinin Belirlenmesi	24
4.18. RNA İzolasyonu	24
4.19. cDNA Sentezi ve PCR Reaksiyonu	25
4.20. İstatiksel Metot	26
<b>5. BULGULAR</b>	28
5.1. Farklı Dozlardaki Cisplatinin Hücre Viabilitesine Etkisi	28
5.2. Cisplatin Uygulamasının Enfekte Hücre Sayısına Etkisi	29
5.3. Spektrofotometrik Yöntemle Viabilite Testi	30
5.4. Cisplatin Tedavisinin NO Üretimine Etkisi	31
5.5. iNOS İnhibitörü L-NAME'in Viabilite Üzerine Etkisi	32
5.6. <i>Brucella</i> Enfekte Makrofajlarda iNOS Transkripsiyonu Üzerine Cisplatinin Etkisi	33
5.7. NAC Uygulamasının Viabilite Üzerine Etkisi	34

5.8. Cisplatinin Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkisi	35
5.9. Cisplatin Tedavisinde GSH Düzeyleri	36
5.10. <i>Brucella</i> Enfeksiyonunda Cisplatin Tedavisinin GSH-Px Aktivitesi Üzerine Etkisi	37
5.11. Katalaz Aktivitesi Üzerine Cisplatinin Etkisi	38
5.12. Ksantin Oksidaz Aktivitesi Üzerine Cisplatinin Etkisi	39
5.13. Cisplatinin Myeloperoksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	40
5.14. ELISA yöntemi ile IL-12 ve TNF- $\alpha$ analizi	41
5.15. RT-PCR Yöntemi ile IL-12 ve TNF- $\alpha$ mRNA Transkripsiyon Analizi	43
<b>6. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	44
<b>7. TEŞEKKÜR</b>	49
<b>8. KAYNAKLAR</b>	50
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	61

**ŞEKİL LİSTESİ**

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 3.1. <i>Brucella spp.</i> 'nin elektron mikroskopundaki görünümü	2
Şekil 3.2. Makrofajlarda intraselüler <i>Brucella</i> etkenlerinin hareket yolları	6
Şekil 3.3. <i>Cis</i> -diamminedichloroplatinum (Cisplatinin) moleküler yapısı	10
Şekil 4.1. Monosit (U937)'nin makrofaja dönüşümü	19
Şekil 5.1. Farklı dozlardaki cisplatinin hücre viabilitesine etkisi	28
Şekil 5.2. Cisplatin uygulamasının enfekte hücre sayısına etkisi	29
Şekil 5.3. Spektrofotometrik yöntemle viabilite testi	30
Şekil 5.4. Cisplatin tedavisinin nitrik oksit üretimine etkisi	31
Şekil 5.5. iNOS inhibitörü L-NAME'in viabilite üzerine etkisi	32
Şekil 5.6. <i>Brucella</i> enfekte makrofajlarda iNOS transkripsiyonu üzerine Cisplatinin Etkisi	33
Şekil 5.7. NAC uygulamasının viabilite üzerine etkisi	34
Şekil 5.8. Cisplatinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi	35
Şekil 5.9. Cisplatin tedavisinde GSH düzeyleri	36
Şekil 5.10. <i>Brucella</i> enfeksiyonunda cisplatin tedavisinin GSH-Px aktivitesi üzerine etkisi	37
Şekil 5.11. Katalaz aktivitesi üzerine cisplatinin etkisi	38
Şekil 5.12. Ksantin oksidaz (XO) aktivitesi üzerine cisplatinin etkisi	39
Şekil 5.13. Cisplatinin myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi üzerine etkisi	40
Şekil 5.14a. ELISA yöntemi ile IL-12 analizi	41
Şekil 5.14b. ELISA yöntemi ile TNF- $\alpha$ analizi	42

**TABLO LİSTESİ**

	<b>Sayfa No</b>
Tablo 1. PCR m-RNA transkripsiyon analizinde kullanılan primerler ve reaksiyon ortamları	27
Tablo 2. <i>Brucella</i> enfekte makrofajlara cisplatin uygulamasının proinflamatuvar sitokinlerin mRNA transkripsiyonları üzerine etkisi	43

**KISALTMALAR**

cAMP	Siklik adenzin monofosfat
CAT	Katalaz
CD	Farklılaşım kümesi
CDDP	Cisplatin
CT	Eşik siklus
eNOS	Endotelial nitrik oksit
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HOBr	Hipobromik asit
HOCl	Hipokloröz asit
HOI	Hipoyodik asit
IL	İnterlökin
INF	İnterferon
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
L <sup>-</sup>	Lipid radikali
L-NAME	N(G)-nitro-L-arjinin metil ester
LOO <sup>-</sup>	Lipid peroksit
LPS	Lipopolisakkarit
MDA	Malondialdehit
MPO	Miyeloperoksidaz
MTT	Thiazolyl blue tetrazolium bromide
NAC	N-asetil sistein
NaF	Sodyum florid
NF-κB	Nükleer faktör-κB
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NOS	Nitrik oksit sentaz



O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit radikali
OH <sup>-</sup>	Hidroksil radikali
ONOO <sup>-</sup>	Peroksinitrit
PBS	Fötal sığır serumu
PBS	Fosfat bafır
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PKA	Protein kinaz A
PMNL	Polimorfnükleer lökosit
PMSF	Fenilmetansülfonilflorid
RES	Retikuloendoteliyal sistem
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloro asetik asit
Th1	Yardımcı T hücre 1
TMB	Tetrametilbenzidin
TNF- $\alpha$	Tümör nekroz faktör alfa
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XO	Ksantin oksidaz

## 1. ÖZET

### ***Brucella melitensis* Enfekte Makrofajlarda Cisplatin Tedavisinin Konak Savunma Sistemini Güçlendirici Etkilerinin Araştırılması**

Bruselloz *Brucella* etkenleri tarafından hayvan ve insanlarda ekonomik ve önemli sağlık sorunları oluşturan kronik karakterde enfeksiyöz bir hastalıktır. Hastalıkta konak canlı savunma sisteminin zayıf uyarılması hastalığın kronikleşmesinde önem taşır. Bu çalışmada, kemoterapötik ajanlardan cisplatin tedavisinin *Brucella melitensis* ile enfekte hücrelerde konak savunma sistemini güçlendirici etkileri araştırıldı. Araştırmada insan monositik hücre hattı (U937) kullanıldı. Monositler makrofajlara dönüştürüldükten sonra *B. melitensis* ile enfekte edildi ve 48 saate kadar 20 µM cisplatin ile muamele edildi. Cisplatinin konakta oksidatif stres, yangı gelişimi ve viabilite üzerine etkileri araştırıldı.

Hücre kültürü süpernatantlarında malondialdehid (MDA) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri, hücre homojenatlarında glutatyon (GSH) düzeyi, antioksidan enzimlerden katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ile oksidanlardan ksantin oksidaz (XO) ve myeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Cisplatinin enfekte hücrelerde canlı-ölü oranı üzerine etkisi tripan mavisi, viabilite ise kantitatif MTT testi ile yapıldı. Yangı mediatörlerinden tümör nekroz faktör (TNF-α) ve interlökin (IL-12) düzeyleri ticari ELISA kitleri kullanılarak yapıldı. Her iki sitokin ile uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) mRNA transkripsiyon analizleri kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile değerlendirildi.

Nitrik oksit enfeksiyöz etkenlere karşı sitotoksistide büyük önem taşıyan bir moleküldür. Ancak *Brucella* ile enfekte insan makrofajlarında NO üretiminin olmadığı saptandı. Cisplatin tedavisi enfeksiyon süresince NO sentezini yüksek düzeylerde artırdı (p < 0.0001). Cisplatinin NO artırıcı etkisinin iNOS aktivasyonu ile gerçekleştiği tespit edildi. Tedavi ile artan NO *Brucella* enfekte makrofajlarda yaklaşık %80 oranında viabilite kaybına neden oldu. Cisplatin GSH düzeyini düşürürken (p < 0.05), MPO ve XO aktivitelerini artırdı (p < 0.001). Antioksidan enzimlerden CAT değişmezken, GSH-Px aktivitesinde artış gözlemlendi (p < 0.001). N-asetil sistein kullanımı cisplatinin neden olduğu viabilite kaybını tamamen önledi. Bu sonuç, cisplatinin enfekte hücrelere yaptığı sitotoksik etkide uyarılan oksidatif olayların önemini göstermektedir. Bununla birlikte cisplatin

hücrelerde lipid peroksidasyonunu da artırdı. *Brucella* enfekte hücrelerde IL-12 ve TNF- $\alpha$  üretimi saptanamazken, cisplatin bu iki mediyatör sentezini düşük düzeyde artırdı. Cisplatinin apoptotik etkisinde her iki sitokin sentezi de rol almış olabilir.

Bu araştırmadan elde edilen verilere göre, *B. melitensis* ile enfekte insan makrofajlarında konak savunma sistemi yeterince uyarılmamaktadır. Cisplatin yangı ve oksidatif stresi uyarak enfekte hücrelerde yüksek düzeylerde ölümlere yol açmaktadır. Bruselloz hastalığının sağaltımında antibiyotik tedavinin yanı sıra apoptotik etkili diğer alternatif yöntemlerin araştırılması önem taşıyabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, Bruselloz, *Brucella melitensis*, Cisplatin, U937.

## 2. ABSTRACT

### **An investigation on the effects of cisplatin treatment whether supports the host defense system in macrophages infected with *Brucella melitensis***

Brucellosis is chronic infectious disease caused by *Brucella spp.* which leads economic and important health problems for human and animals. Weak stimulation of the host's immune system during the disease by Brucellae is an important factor for the chronic brucellosis. In this study, the intensifying effects of cisplatin, a chemotherapeutic agent, on the host's defense system in *Brucella melitensis* infected macrophages was investigated. For this purpose, human monocytic cell line (U937) was used. Monocytes were first differentiated into macrophages and infected with *B. melitensis* then treated by 20  $\mu$ M cisplatin up to 48 hours. The effect of cisplatin on viability, oxidative stress and progression of inflammation was studied in the host.

Malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels in cell culture supernatants, glutathione (GSH) levels in cell homogenates, the activities of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and the activity of oxidants xanthine oxidase (XO) and myeloperoxidase (MPO) were analyzed by a spectrophotometer. Live-dead ratio rate was determined by trypan blue dye exclusion and the effect of cisplatin on viability was verified by the quantitative MTT test. Inflammatory mediators such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-12 (IL-12) levels were determined by commercial ELISA kits. Both of the cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA transcription analyses were evaluated by quantitative polymerase chain reaction (PCR).

Nitric oxide has an important cytotoxic molecule against infectious agents. However no production of NO was established in *Brucella* infected macrophages. Cisplatin treatment was increased NO synthesis at very high levels ( $p < 0.0001$ ) during infection periods. It was determined that cisplatin' enhancement of NO concentration managed by iNOS activation. Elevated NO caused viability lost approximately 80 % of *Brucella* infected macrophages. Although cisplatin decreased GSH levels ( $p < 0.05$ ), it significantly increased MPO and XO activities ( $p < 0.001$ ). While CAT activity was not changed, an increase of GSH-Px activity was observed ( $p < 0.001$ ). N-acetyl cysteine treatment was

completely prevented the viability lost caused by cisplatin. This result demonstrated that oxidative events which were induced by cisplatin treatment are important for the combat brucellosis. However, cisplatin has also increased lipid peroxidation in the cells. There was no IL-12 and TNF- $\alpha$  production in *Brucella* infected cells, though cisplatin increased both of the mediators at low levels. These cytokines may play role on the cytotoxic effect of cisplatin.

It was concluded that host' defense mechanisms was not induced enough in *B. melitensis* infected cells. Cisplatin caused excessive amounts of death in *Brucella* infected cells with cytotoxic action by inducing inflammation and oxidative stress. Besides antibiotic treatments in human brucellosis, other apoptotic agents should be considered and more investigated as an alternative method.

**Keywords:** Apoptosis, Brucellosis, *Brucella melitensis*, Cisplatin, U937.

### 3. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Bruselloz, *Brucella* türü bakterilerin neden olduğu, temelde koyun, keçi, sığır, domuz gibi evcil hayvanlarda hastalık yapan, ancak çeşitli yollarla insanlara bulaşan kronik seyirli bir enfeksiyon hastalığıdır. İnsan brusellozu, akut dönemde yüksek ateş, şiplenomegali, gece terlemesi, eklem ağrısı gibi belirti ve bulgularla seyredebildiği gibi; sinsi başlangıçlı, romatizmal ve psikiyatrik hastalıkları taklit edip atipik belirti ve bulgularla seyrederek kronik bir özellik kazanabilir (Young 1995). Bu hastalık ilk kez 1885’de Malta adasında Sir David Bruce tarafından tanımlanmış ve Malta Hastalığı olarak da isimlendirilmiştir. Hastalık dalgalı humma ve koyunlardan insanlara bulaşması nedeni ile de halk arasında koyun hastalığı gibi isimlerle de anılır (Gotuzzo ve Cellillo 1992). Bruselloz çoğu gelişmiş ülkede eradike edilmiş olmakla birlikte aralarında Türkiye’nin de bulunduğu bazı Akdeniz ülkeleri, Arap Yarımadası, Hindistan, Meksika, Orta ve Güney Amerika’nın bazı bölgelerinde endemik olarak görülmektedir (Corbel 1997).

Hayvanlarda yavru kayıpları, süt veriminde azalma ve kısırılık gibi olumsuz etkileri dikkate alındığında bruselloz evcil hayvanların en önemli hastalıklarından biri olarak kabul edilir. Hastalığın çabuk yayılması, kontrol ve mücadelesinin güçlüğü ve bu mücadelenin uzun süre alması sebebiyle önemli ekonomik kayıplara sebep olur (Türütoğlu ve ark 2003). Hayvan ve hayvansal ürünlerin ticaretine engel teşkil etmesi ve çoğunluğu kırsal kesimde bulunan kısıtlı imkanlara sahip hayvan yetiştiricilerinin sosyo-ekonomik gelişimini engellemesi gibi zararları da önemlidir. Bununla birlikte insan sağlığı açısından taşıdığı risk hastalığın önemini daha da artırmaktadır. Hayvanlarda bruselloza karşı etkin aşılama programları uygulanmakla birlikte, hastalığa yakalananlar tedavi edilmez ve koşullu olarak tüketime sunulur. İnsanlarda tedavisi uzun süren bu hastalık, fiziksel yetersizlik ve iş gücü kayıplarına neden olurken, tedavi ve hastane giderleri de önemli bir ekonomik problemdir. İnsanları bu hastalıktan koruyabilecek etkili bir aşı henüz geliştirilememiştir. Brusellozun insanlarda relaps özelliği taşıması ve tedavisinin uzun sürmesi, antibiyotik tedaviye rağmen hastaların bir kısmında tekrarlaması önemini artırmaktadır (Gross ve ark 2003, Ko ve Splitter 2003, Christopher ve ark 2005).

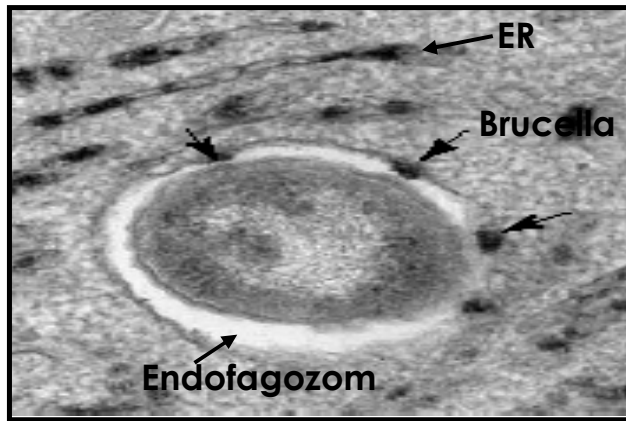
Bu araştırmanın amacı, antibiyotiklerle tedavisi güç olan ve kronik karakter taşıyan insan brusellozunda alternatif tedavi yollarının aranmasıdır. Bu sebeple konakta antibakteriyel etkili oksidatif olayların, immun sistemin ve apoptozun uyarılması için *B. melitensis* ile enfekte makrofajlarda kanser tedavilerinde sık kullanılan bir kemoterapötik

ajan cisplatin kullanıldı. Kronik özellik taşıyan brusellozda konak savunma mekanizmaları ve cisplatinin bunlar üzerine olan etkisi araştırıldı. İntrasellüler bir etken olan *Brucella* ve konak arasındaki immunolojik ve biyokimyasal ilişki ve hastalığın kronikleşmesindeki etkenlerin tanımlanması tedavide önem taşıyacak gelişmeler olacaktır.

### 3.1. Etiyoloji

*Brucella* etkenleri; 0,6 µm eninde, 1,5 µm boyunda, Gram-negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, aerob kokobasillerdir (Şekil 3.1). Etkenler, 37 °C (10-40 °C), pH: 6.6-7.4'de optimal çoğalır ve hemolitik olmayan, pigmentsiz düz ya da pürüzlü koloni yaparlar. Düz koloniler daha virulandır ve virulanstan hücre duvarındaki lipopolisakarit sorumludur. İntrasellüler ortamlarda çoğalırlar ve böylece organizmanın savunma mekanizmalarından kaçınılırlar (Christenson 2002).

İnsanlarda hastalık etkeni başlıca *Brucella* türleri ve rezervuarları şunlardır; *Brucella melitensis*; koyun ve keçilerde, *B.abortus*: daha çok sığır ve mandalarda, *B.canis*: köpeklerde, *B.suis*: domuzda enfeksiyon yapar (Pappas ve ark 2006). Türkiye'de hastalık etkeni olarak izole edilen türlerin büyük çoğunluğunun *B.melitensis* olduğu bildirilmiştir (Baykam ve ark 2002). İnsanlarda enfeksiyona yol açan türler arasında en virülanı *B.melitensis*'dir (DelVecchio ve ark 2002). Endemik bölgelerde pastörize edilmemiş koyun ve keçi sütünden yapılan peynirler *B.melitensis* enfeksiyonunun en önemli kaynağıdır. Bakteriler süt, krema ve peynir gibi gıdalarda uzun süre (8-11 hafta) canlı kalabilir. Hastalığın inkübasyon süresi *Brucella* türüne, bulaşma yoluna ve alınan bakteri sayısına bağlı olarak farklılık gösterir (Young 1995).



Şekil 3.1. *Brucella spp.*'nin elektron mikroskopundaki görünümü

İnsanlarda bruselloz genellikle üşüme, titreme, ateş, halsizlik, iştahsızlık, eklem, sırt ve baş ağrısı belirtileriyle başlar. Ateş yavaş yavaş artış göstererek en yüksek seviyeye ulaşır, ardından aynı şekilde yavaş yavaş azalma olur (tipik dalgalı ateş). Bruselloza bağlı gece terlemeleri görülebilir. Hastalığın ağır seyrettiği olgularda terleme daha yoğundur. Tüm eklem ve kaslarda ağrı ile birlikte halsizlik görülebilir. Gezici nitelikte artrit ve sırt ağrısı sık görülür. İştahsızlık hastalığın ilk bulgularından biri olduğu için araştırılmalıdır (Fuing ve Groshek 2000).

### 3.2. Epidemiyoloji

Hastalığın hayvanlardan insanlara bulaştırılmasında infekte hayvan dokuları, kanı, bütünlüğü bozulmuş deri veya konjonktivaya direkt temas; kontamine et, süt ve süt ürünlerinin sindirim kanalından alınması ve inhalasyon olmak üzere üç önemli yol bilinmektedir. İnfekte hayvan organları ile temas hayvan kesicileri, kasaplar ve veteriner hekimler arasında görülen sık bulaşma yollarındandır. Pastörize süt kullanımının yaygınlaştırılmadığı, çiğ süttten yapılmış peynir tüketimi alışkanlığına sahip özellikle kırsal bölgelerde en önemli bulaşma yolu intestinal yoldur. Aerosol yol ise sıklıkla laboratuvar çalışanlarında görülmektedir (Young 1995).

### 3.3. Patogenez

Brusellozun oluşabilmesi için *Brucella* etkenlerinin vucuda girdikten sonra yaşamını sürdürmesi gerekir (Dornand ve ark 2002). *B.melitensis* hücre duvarında bulunan lipopolisakaritler (LPS) zayıf antijenik özellik taşır, bu nedenle bakteriye karşı konak immün yanıtın da hafif derecede gelişimine neden olur. Ayrıca, *Brucella* türleri kültüre edildikten sonra ortamdaki etkilendikleri, bazı proteinler üreterek stres koşulları karşısında tepki verebildikleri gösterilmiştir (Corbel ve MacMillan 1998). Vücuda giren bakteriler öncelikle mononükleer veya polimorf nükleer lökositlerle (PMNL) fagosite edilir. Diğer türlerin aksine, *B. melitensis* PMNL'de intrasellüler ortamda bakteri öldürücü mekanizmalara direnç gösterir. Bakteriler çeşitli yollardan organizmaya girdikten sonra fagosite edilen, ancak PMNL'ler tarafından öldürülememiş bakteriler hızla bölgesel lenf bezlerine ilerler ve burada üredikten sonra lenf yolu ile genel dolaşıma karışırlar. Gelişen bakteriyemi sonucunda tüm vücuda yayılır, bakterinin daha çok retikuloendotelial sistem (RES) organlarına lokalize olma eğilimi vardır. Özellikle dalak, karaciğer, kemik iliği ve lenf bezleri olmak üzere, organ fagositlerince tutulduktan sonra bu hücreler içinde öldürülememiş olan bakteriler intrasellüler olarak üremelerini sürdürürler (Young 1995).



Makrofajlar tarafından fagositozu takiben bakteriler 62, 28, 24 ve 17 kDa ağırlıklarında özel proteinler üretir. Bu proteinlerin makrofajlar tarafından bakterilerin öldürülmesi amacıyla oluşturulan asidik ortama direnç sağladığı rapor edilmiştir (Teixeira-Gomes ve ark 2000).

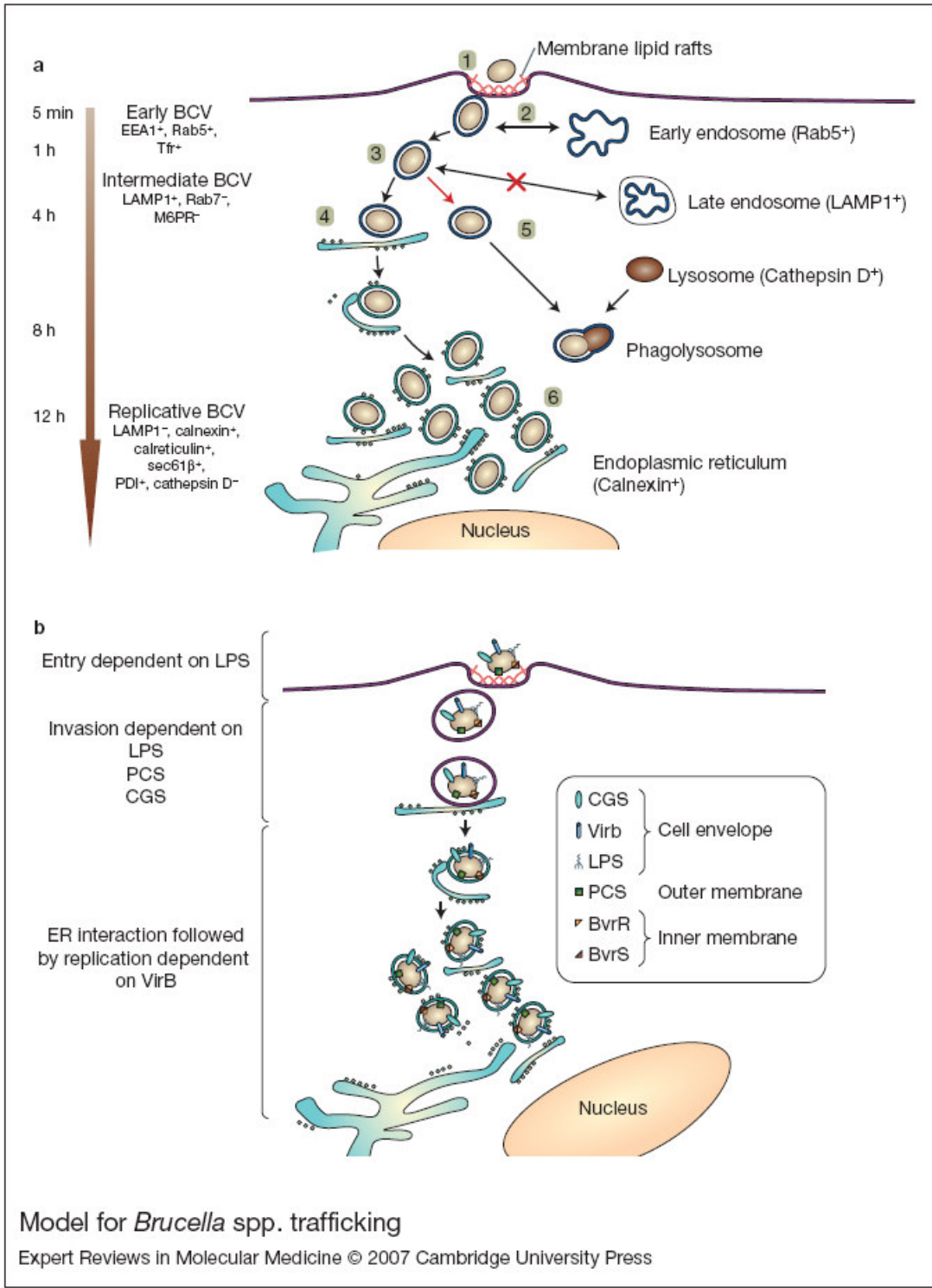
*Brucella* etkenlerinin fagositik hücreler içinde yaşayıp çoğalmasında etkili olduğu ileri sürülen mekanizmalar arasında fagolizozom füzyonunun engellenmesi, lizozomal enzimlere direnç göstermeleri, konaktan hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) üretiminin önlenmesi ve böylece oksidatif mekanizmalara direnç göstermeleri sayılabilir. Ayrıca etkenlerin süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitesine sahip olmaları ile reaktif oksijen metabolitlerini uzaklaştırarak oksidatif yıkımlara karşı koymaları etkenlerin geliştirdiği savunma mekanizmaları arasında bulunur (Young 1995, Gross ve ark 2000, Doganay ve Aygen 2003).

Mononükleer hücrelerde progressif proliferasyon sonucu etkenlerin yerleşim gösterdiği RES organları büyür (şıplenomegali, hepatomegali gibi). Hücre içerisinde üremekte olan bakteri, aynı zamanda antikör tehdidinden ve kullanılan antimikrobiyal ajanlardan uzun süre korunmuş olur. Bu nedenle bruselloz tedavisi uzun sürer. Bakteriye karşı immünitinin gelişmesi ve makrofajların aktive olması ile mikroorganizmalar öldürülmeye başlanır ve bakterinin sahip olduğu hücre duvar antijenleri (LPS = endotoksin) kana geçer. Organizmanın bu endotoksine yanıtı ile hastalıkta görülen birçok belirti ortaya çıkar. Aktive makrofajlar ile persistan mikroorganizmalar arasında devam eden savaşında, karakteristik doku yanıtı olarak granülomatöz reaksiyonlar gelişerek; doku ve organlarda granülomlar oluşur. Savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılamayan bakteriler, granülomlarda sınırlandırılmaya çalışılır. Özellikle dalak, karaciğer ve kemik iliğinde epiteloid hücreler, plazma hücreleri ve mononükleer hücreler ile çevrili granülomlar, brusellozun karakteristik histopatolojik görünümünü oluşturur (Chugh ve ark 2001).

*Brucella* etkenleri *Salmonella* ve *E.coli* gibi diğer bazı Gram negatif bakterilerde bulunan ekzotoksin, invaziv proteazlar, kapsül, virülans plazmidler, endotoksik lipopolisakkaritler, lizojenik fajları ve apoptoz (programlı hücre ölümü) uyarıcı faktörleri bulundurmazlar (Gorvel ve Moreno 2002, Moreno ve Moriyon 2002). Bu nedenle etkenler konak hücre membranında bir bozukluk oluşturmadan RES'e geçerek mononükleer hücrelerce fagosite edilip intrasellular ortamda çoğalıp gelişebilme kabiliyetine sahiptirler (Ficht 2003, Gross ve ark 2003). Bakteriler, fagolizozom füzyonunu engeller ve fagosite

edilmelerine rağmen lizozomal enzimlere dirençli oldukları için ortamdan kaldırılamazlar. Konak ile patojen arasındaki immünolojik ve biyokimyasal ilişki ve altında yatan moleküler mekanizmalar henüz bilinmemektedir. Ancak etkenlerin fagositozunu takip eden ilk saatlerde makrofajlarda siklik adenozin monofosfat (cAMP) sentezi uyarılarak protein kinaz A (PKA) yolağının uyarıldığı, bunun sonucu yangının baskılanıp etkenlerin konakta yerleşip yaşama şansı bulduğu ileri sürülmüştür (Gross ve ark 2003).

Apoptoz organizmanın savunma mekanizmalarından birini teşkil eder. Makrofajlar intrasitoplazmik bakteriyel etkenleri ortadan kaldırmak için kendi apoptozuna neden olabilir. Makrofajların bakteri fagositozunu takiben patojenin öldürülmesi için konak savunma mekanizmaları ardışık olarak (cascade) harekete geçer (Şekil 3.2). Ancak *Brucella* enfeksiyonlarında apoptozun engellenmesi hastalığın gelişiminde önemli bir basamağı teşkil eder. Gross ve ark (2000) *B. suis* ile enfekte insan monositlerinin spontan olarak görülen apoptozu baskıladığını saptamışlardır. *Brucella* etkenlerinin enfekte makrofajlarda geliştirdiği bir mekanizma ile apoptozu inhibe etmesi patojenin intrasellüler ortamda uzun süre yaşama şansını artırmaktadır (Dornand ve ark 2002, Gross ve ark 2004). Böylece patojen etkenler fagositik hücrelerde antibakteriyel etkilerinden korunmuş olur.



Şekil 3.2. Makrofajlarda intraselüler *Brucella* etkenlerinin hareket yolları (Fugier ve ark 2007).

### 3.4. Brusellozda İmmünite

Konak hücre sitoplazmasında kalıcı parazitlik, etkenin kendi saldırganlığına dayanabilmesi anlamına gelmektedir. Bu nedenle intrasellüler bakterilerin self-toksitesi düşük olmaktadır. Hücre içinde yaşama, koruyucu immün cevabın niteliklerini belirgin şekilde etkiler. Brusellozda hücrel immünite ön plandadır. Enfeksiyonun kontrolü yardımcı T lenfositlerce (Th1) salgılanan sitokinlerin makrofajların bakterisidal mekanizmalarını aktive etmeleri ile gerçekleşmektedir. *B.melitensis*'in meydana getirdiği enfeksiyonun iyileşmesinde zayıf da olsa Th1 tip immün yanıt rol oynamaktadır (Ko ve Splitter 2003, Akbulut ve ark 2007). Brusellozda gelişen doğal immün yanıt, ilk etapta vücuda giren bakteri sayısını azaltmaya yöneliktir. Bu işlemin gerçekleşmesi sürecinde, Th1 tip immün yanıtın konakta hakimiyeti sağlanmaktadır. T hücrelerinin *Brucella* enfeksiyonundaki ana görevi makrofajların ve sitotoksik T-lenfositlerin aktivasyonu ve IgG2a ve IgG3 izotip değişimi için gerekli interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) salgılamaktır (Dornand ve ark 2002). CD4+ (yardımcı T-hücre), CD8+ (sitotoksik T-hücre) ve  $\gamma\delta$  T hücreleri tarafından salınan IFN- $\gamma$  makrofajların bakterisidal fonksiyonunu harekete geçirir (Yingst ve Hoover 2003). Aynı zamanda sitotoksik CD8+ ve  $\gamma\delta$ -T hücreleri infekte makrofajları öldürmektedir. Th1 aktivasyonu sonucu gelişen IgG2a ve IgG3 patojenin opsonizasyonunu sağlayarak fagositozunu kolaylaştırmaktadır (Dornand ve ark 2002).

İntrasellüler bakteri enfeksiyonlarında, humoral immünitenin etkisi oldukça sınırlıdır, başlangıçta IgM sonra IgG salgılanır. Tedavi ile iyileşen olgularda IgG azalır ancak IgM yıllara göre düşük titrede kalabilir. IgG seviyesi yüksek ya da titresi giderek artıyorsa enfeksiyonun devam ettiği ya da relaps geliştiği düşünülür (Christenson 2002).

### 3.5. İnsan Brusellozunda Tedavi Uygulamaları

İnsanlarda hastalığa bağlı ciddi komplikasyonların ve tekrarlayan enfeksiyonların önlenmesi için uygun ve yeterli tedavi önem kazanmaktadır (Shamelian 2000, Pappas ve ark 2005). Bununla birlikte uzun süren araştırmalara rağmen bruselloz tedavisinde istenilen başarıya henüz ulaşılamamıştır. Bruselloz tedavisinde günümüzde en yaygın kullanılan antibiyotikler tetrasiklin, doksisisiklin, rifampisin, streptomisin, gentamisin, kotrimoksazol ve seftriaksondur (Agalar ve ark 1999). Tedavide ikili, bazı durumlarda da üçlü kombinasyonlar önerilmektedir (Shamelian 2000). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) insanlarda bruselloz tedavisinde doksisisiklin ve rifampisin veya streptomisin

kombinasyonlarını önermektedir. Buna göre, rifampisin (600-900 mg/gün) ve doksisisiklin (200 mg/gün) kombinasyonun 6 hafta süreyle kullanılması tavsiye edilmektedir (WHO 2004). Bazı araştırmacılar ise streptomisin ve tetrasiklin kombinasyonunun tedavide daha başarılı olduğunu ve bu tedavi uygulandığında nükslerin daha az görüldüğünü savunmaktadır (Solera ve ark 1997). Rifampisin ve tetrasiklin kombinasyonu bazı hasta gruplarında denenmiş olmasına rağmen yeterli sonuç elde edilememiştir. İmmünoşüprese ajanlarla tedavi denenmiş olmasına rağmen doz ayarlaması yapılamadığı için başarısız kalmıştır (Raptopoulou-Gigi ve ark 1983). Antiinflamatuvar ajanlar bazı hasta gruplarında da hastalık semptomlarının azalmasını sağlamakla birlikte etkisi geçici olmaktadır (Solera ve ark 1997). Antijen tedavisi çok tehlikeli görüldüğü için önerilmemektedir (Corbel ve MacMillan 1998).

Cisplatin kanser tedavilerinde sık kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir. DNA'da replikasyon ve transkripsiyonu inhibe ederek hücrelerde apoptoza neden olur. Bununla birlikte cisplatin uygulanan makrofajlar tümörisidal kapasite kazanır ve yangı uyarıcı interlökin-12 (IL-12) ve tümör nekroz faktör (TNF- $\alpha$ ) gibi sitokinler ile reaktif oksijen ve nitrojen türlerini üretirler. Bu çalışmada makrofajlarda intrasellüler yerleşim gösteren, hücre içinde yaşayıp çoğalabilen *Brucella* etkenleri üzerine cisplatin tedavisinin etkileri araştırıldı.

### 3.6. Cisplatin

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum; CDDP) (Şekil 3.3) mesane, testis, ovaryum, baş ve boyun bölgesi kanser türlerinin tedavisinde yaygın biçimde kullanılan platin türevi bir kemoterapötik ajandır (Rosenberg 1999, Wang ve Lippard 2005, Abu-Surrah ve Kettunen 2006). Cisplatin kanser tedavilerinde sitotoksik etkilerini birkaç farklı yolla gösterir. DNA çift zincirinde yan yana veya birbirine yakın konumda bulunan guanin bazları arasında zincir içi kovalent çapraz bağlanma yapar. DNA'ya bağlanan cisplatin DNA'nın helozonal yapısında anlamlı tahribatlara neden olur, sonuçta DNA replikasyon ve transkripsiyonunda inhibisyon sonucu apoptoz gelişir (Jamieson ve Lippard 1999, Lee ve ark 2002). Ancak yüksek düzeyde cisplatin uygulamalarının nefrotoksisite gibi yan etkileri de vardır (Kuhlmann ve ark 1998, Zicca ve ark 2002). Toksik doz 300  $\mu$ M ve üzeri konsantrasyonlar olarak bildirilmektedir (Mishima ve ark 2006).

Farklı hücre çeşitlerinde yapılan araştırmalarda kemoterapik ilaçların apoptozu ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu uyardığı gösterilmiştir (Antunes ve ark 2000,

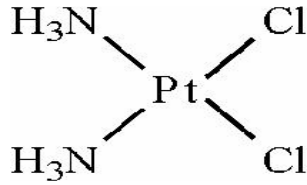
Şentürker ve ark 2002). Cisplatinin diğer bir etkisi ise reaktif oksijen ve nitrojen türleri üretimini uyarmaktır. Bunun sonucu hücre içi mikroorganizmaların makrofaj ve monositler tarafından öldürülmesini içeren hücrel immun yanıt gelişir (Parks ve ark 1994, Doner ve ark 1999, Singh ve Sodhi 1999).

Kemik iliği makrofajlarında yapılan bir araştırmada cisplatin uygulamasının IL-1 ve TNF- $\alpha$  ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Suresh ve Sodhi 1991). İnsan nöroblastoma hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada ise cisplatinin TNF- $\alpha$  ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) mRNA transkripsiyonunu uyardığı rapor edilmiştir (Ogura ve ark 1997). Üretimi artan nitrik oksit (NO) makrofajların kanser hücreleri ve bazı patojenleri ortadan kaldırmasını uyarır (Srivastava ve ark 1999; Watanabe ve ark 2000). Uzun süreli cisplatin tedavisi alan hastaların böbrek dokularında lipid peroksidasyonun arttığı (Hanneman ve Baumann 1991), glutatyon (GSH) düzeyi ve bazı antioksidan enzimlerin aktivite düzeylerinde değişikliklere neden oldukları gösterilmiştir (Kruidering ve ark 1997, Halliwell ve Whiteman 2004). Ayrıca kaynaklar intrasellüler glutatyon düzeyinin azalmasıyla birlikte, cisplatinin sitotoksik etkisinde bir artış olduğunu bildirilmektedir (Kazuhiro ve ark 1995).

Ratlarda yapılan *in vivo* çalışmalarda cisplatinin süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini düşürdüğü, böylece reaktif oksijen türlerini temizleme görevi olan redükte glutatyon seviyesini de azalttığı gösterilmiştir (Kruidering ve ark 1997, Kuhlman ve ark 1997). Artan reaktif oksijen türleri de DNA hasarına neden olur (Salahudeen ve ark 1996). Cisplatin dokuda SOD ve GSH-Px gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini azaltırken, süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) başta olmak üzere oksijen radikallerinin artışına yol açar (Sugiyama ve ark 1989). Mitokondri hasarı cisplatin nefrotoksisitesinde önemli rol oynamaktadır. Cisplatinin direkt olarak hücre DNA'sı ile etkileşime girmesi sonucunda mitokondrial fonksiyon bozukluğuna yol açan süperoksit ve hidroksil radikali (OH $\cdot$ ) açığa çıkar (Ramesh ve Reeves 2002).

Satyanarayan ve ark (2002) ratlarda yaptıkları araştırmalarda cisplatinin serbest oksijen radikali üretimine ve nükleer faktör-kB (NF-kB) aktivasyonuna yol açarak adozin A<sub>1</sub> reseptör sentezinin artışına neden olduğu belirtilmektedir. Cisplatin adozin A<sub>1</sub> reseptör düzeyini de genetik olarak etkiliyor olabilir. Adozin metaboliti olan inozinin ksantin oksidaz tarafından metabolize edilmesi sırasında serbest oksijen radikali üretimine yol açarak oksidatif hasar oluşturması cisplatin etkisinde önemli rol oynayabilir.

Bu araştırmada cisplatinin apoptozu uyarıcı ve bakterisidal etkileri serbest radikal üretimini artırarak bruselloz tedavisinde yer bulup bulamayacağı analiz edildi.



Şekil 3.3. *Cis*-diamminedichloroplatinum (Cisplatinin) moleküler yapısı.

### 3.7. Serbest Radikaller, Antioksidanlar ve Bruselloz

#### 3.7.1. Serbest radikaller

Serbest radikaller bir atom veya molekül yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron içeren yüksek oranda reaktif kimyasal ürünlerdir (Woods ve ark 2001). Serbest radikaller; kovalent bağ taşıyan bir molekülün yıkımı, bir elektronun eklenmesi, bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Biyolojik sistemlerde ise en fazla elektron transferi ile oluşurlar (Schonelch 1999, Halliwell ve Gutteridge 2001).

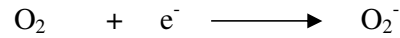
Hücre organellerinden her biri farklı miktarlarda serbest radikal üretimine sebep olabilir. Reaktif oksijen türleri (ROS) organizmada en fazla fagositik hücreler tarafından üretilir. Fagositik hücreler ROS üretimini çeşitli metabolik yangırlarla uyarıldıklarında, oksijeni indirgeyerek gerçekleştirirler. Başlıca serbest radikal kaynakları arasında mitokondrial elektron transport zinciri, otooksidasyon reaksiyonları, NADPH bağımlı oksidazlar, redoks döngüsü, araşidonik asit metabolizması bulunur (Thannickal ve Fanburg 2000, Seshiah ve ark 2002).

Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil ve makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (Halliwell ve ark 1992). Serbest radikaller, sıklıkla hücre membranındaki lipid komponentlerine etki ederek lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır (Mansour ve ark 2002). Ayrıca, protein sentezinde azalmaya sebep olduğu, hücre bileşenleriyle reaksiyona girerek hücrenin asli görevlerini yapmasını engellediği ve DNA'yı bloke eden organik peroksitlerin oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir (Santovito ve ark 2000). Serbest radikaller mitokondrilerin fonksiyonunda bozukluklara da sebep olmaktadır (Leibbrandt ve ark 1995).

Makrofajlar patojenlere karşı ürettikleri ROS ve RNS aracılığıyla bakterisidal etkide bulunur. Bu radikallerin üretiminde IL-12 ve TNF- $\alpha$  da sorumludur (Ko ve Splitter 2003). Bu hücreler enfeksiyöz hastalıklarda etkenlerin ortadan kaldırılmasında büyük önem taşır. Ancak yapılan birçok araştırmada insan brusellozunda makrofaj ve diğer bağışıklık sistem hücrelerinin yeterince uyarılmadığı saptanmıştır (Caron ve ark 1994, Erdogan ve ark 2006, 2008). İnsan brusellozunda NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> gibi serbest radikal molekülleri ile TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-12 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin sentezi uyarılmaz ya da yetersiz düzeylerde uyarılır.

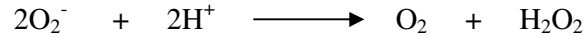
### 3.7.1.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Moleküler oksijen (O<sub>2</sub>) diradikal olarak tanımlanmıştır. Süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) radikali kararsız bir yapı olarak moleküler oksijenin bir elektron indirgenmesiyle oluşur.



Süperoksit anyonu serbest radikal olmakla birlikte, güçlü derecede zararlı değildir. Önemi hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptoz, yangı ve vasküler fonksiyonların regülasyonu gibi etkilere sahiptir. Azalmış süperoksit düzeyleri, makrofajlarda bakteriyel enfeksiyonlara artmış bir yatkınlığa yol açabilir (Vincent ve ark 2004, Cherubini ve ark 2005).

Oksijen molekülünün doğrudan indirgenmesi veya süperoksit anyonuna bir elektron eklenmesiyle (süperoksit dismutasyonu) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radikali oluşur.

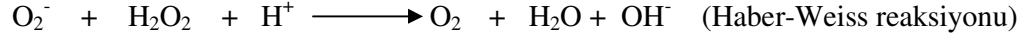
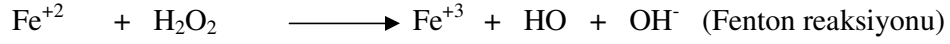


Hidrojen peroksit bakterilere karşı lökosit defansının diğer bir komponentidir ve antibakteriyel etkilidir. Ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fagositoz yapan hücreler tarafından üretilip salınmaktadır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu antibakteriyel mekanizmada çok önemli bir yer tutar (Desideri ve Falconi 2003, Vincent ve ark 2004).

Hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır (Reddy ve Yao 1999). Hücre nükleusundaki membran



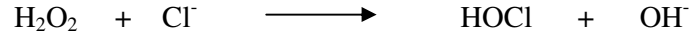
bariyerlerini kolayca geçmesi ve mutajenik olarak DNA'yı etkilemesi nedeniyle hidroksil en etkili radikaldir (Parke 1999).



Brusellozda  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\text{O}_2^-$  anyonları konsantrasyonunda belirgin bir artışın bulunmadığı bilinmektedir (Gee ve ark 2004). *Brucella* etkenlerinin SOD ve CAT aktivitelerine sahip olmaları da bu reaktiflerin ve bunlardan türeyen diğer oksidanların enfeksiyonda düşük düzeyde kalmasına neden olur (Kim ve ark 2000). Bu sebeple konak savunma sistemi bakteriyel etkenlerle mücadelede yetersiz kalır.

### 3.7.1.2. Hipokloröz asit (HOCl)

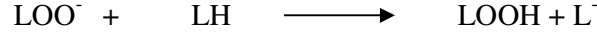
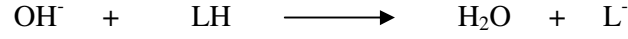
Myeloperoksidaz enzimi, hidrojen peroksit varlığında klorür oksidasyonunu katalizleyerek etkili bir antibakteriyel ajan olan hipokloröz asiti (HOCl) oluşturur. HOCl, fagositik hücreler tarafından bakteriler üzerine sitotoksik etkide önemli rol oynar. Aktive olan nötrofiller, monositler ve makrofajlar süperoksit radikalini üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürme mekanizmalarında önemli rol oynar. (Carr ve ark 2000).



### 3.7.1.3. Lipit peroksidasyonu

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas biyomoleküllerdendir. Hücre membranlarında, bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olabilir. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendine devam eden zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Lipit peroksidasyonunda zincirleme reaksiyonun başlatılması için tetikleyici faktör gereklidir. Sözü edilen bu faktörün  $\text{OH}^-$  radikali olduğu kabul edilmektedir (Marnett 2002, Nyska ve Kohen 2002).  $\text{OH}^-$  radikali, bir yağ asitinin metilen molekülünden bir hidrojen atomu ( $\text{H}^+$ ) kopararak bir lipid radikalini ( $\text{L}^-$ ) oluşturur. Lipid radikalini de oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksit radikalini ( $\text{LOO}^-$ ) oluşturur. Lipid peroksit radikali diğer doymamış yağ asitleriyle

reaksiyona girer. Böylece zincirleme reaksiyonlar başlar (Young ve Woodside 2001, Niki ve ark 2005).



Hücre membranlarında lipid ve lipid peroksit radikallerinin oluşması, ROS'nin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) oluşmaktadır. MDA lipid peroksidasyonunun en önemli ürünlerinden biridir. MDA'nın ve diğer oksijen radikallerinin DNA ile etkileşime girerek bakteriler üzerinde mutajenik etkiye sahip olduğu çeşili çalışmalarda gösterilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda bruselloz hastalığında lipid peroksidasyonunun düşük düzeyde arttığı gösterilmiştir (Marnett 2002).

#### 3.7.1.4. Nitrik oksit (NO)

Nitrik oksit (NO) yarı ömrü kısa ve gaz yapısında bir moleküldür (Grisham 1997). Nitrik oksit, üzerinde yük taşımaması ve çiftleşmemiş elektron bulundurması hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlar. Diğer serbest radikaller hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda önemli fizyolojik işlevlerde rol alır. NO bu özellikleri ile ideal bir fizyolojik haberci molekülü özelliği kazanmaktadır (Lowenstein ve ark 1994). İnterferon veya bakteri lipopolisakkaritleri tarafından aktive edilen makrofajlarda, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-arjininden sentezlenen NO, intrasellüler bakterilere karşı çok önemli bir defans mekanizmasında rol oynar (Chiueh 1999; Ghafourifar ve Cadenas 2005). Nitrik oksit sentazın, nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenbilir NOS (iNOS) olmak üzere üç farklı izoenzimi vardır. İlk iki formu konstitif olup, kalsiyuma bağlı olarak endotelial NO'nin üretiminden sorumlu iken iNOS kalsiyumdan bağımsızdır ve büyük oranda makrofaj kökenli NO sentezinden sorumludur (Ahren ve ark 1999, Lopez-Urritia ve ark 2000).

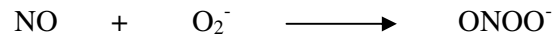


Makrofaj kaynaklı NO *Brucella* etkenleri üzerinde sitotoksik etki yapar (MacMicking ve ark 1997). Yüksek NO, bakterilerde DNA sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan ribonükleotid redüktazı bloke eder ve hücre DNA'sının deaminasyonu ile sitotoksik etki yapar (Lin ve Chadee 1992, Taylor-Robinson ve ark 1996). Bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, düz kasların gevşemesi, vazodilatasyon ve nörotransmisyon içeren çeşitli fizyolojik süreçlerde de nitrik oksit görev almaktadır (Bergendi ve ark 1999, Alderton ve ark 2001).

iNOS ekspresyonu normal fizyolojik şartlar altında gerçekleşmez. Yangı veya bakteriyel enfeksiyon durumlarında sitokinler veya endotoksinler tarafından indüklenir ve uzun dönemde yüksek miktarlarda NO üretilir. iNOS başta makrofajlar olmak üzere polimorf nükleer lökositler, nötrofiller, hepatositler, düz kas hücreleri ve kondrositler gibi birçok hücrede uyarılabilir. iNOS tarafından üretilen NO makrofajlarda antimikrobiyal etkiye sahiptir ve bu nedenle nonspesifik konak savunma sisteminin önemli bir parçasıdır (Vincent ve ark 2004, Pratic`o 2005).

NO üretimi IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi yangısal sitokinler tarafından da uyarılır. Aynı zamanda LPS gibi bakteriyel ürünler ile de NO sentezi artar. Ancak insanlarda *Brucella* enfeksiyonlarında bakterisidal etkili NO salgısının yeterince uyarılmadığı bilinmektedir (Caron ve ark 1994, Gross ve ark 1998, Bagues ve ark 2005, Melek ve ark 2006). Bu sebeple patojenler NO kaynaklı oksidatif mekanizmalara direnç gösterir ve antimikrobiyel saldırılardan korunarak kendilerine önemli bir avantaj sağlarlar (Orozco ve ark 2003, Gross ve ark 2004). Kemirgenlerde bruselloz hastalığı enfeksiyondan 2-3 ay sonra kendiliğinden ortadan kalkar. Bu hayvanlarda hastalık etkenlerinin organizmadan atılmasında NO üretimi önem taşır. Lopez-Urritia ve ark (2000), Erdoğan ve ark (2008) ratlarda yaptıkları deneysel çalışmalarda *B. melitensis* enfeksiyonlarında NO düzeyinin kontrol grubuna göre arttığını göstermişlerdir.

Nitrik oksit ve süperoksit radikalinin etkileşmesi sonucu önemli derecede kuvvetli oksidatif bir molekül olan peroksinitrit (ONOO $^-$ ) oluşur. Böylece nitrik oksitin fizyolojik etkisi koybolur ve oksidatif etkisi ortaya çıkar. Peroksinitrit, NO toksisitesinin başlıca sorumlusudur. Bu serbest radikal DNA kırılmalarına ve lipitlerde oksidasyonlara neden olabilir (Carr ve ark 2000).



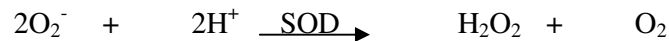
### 3.7.1.5. Ksantin oksidaz enzimi (XO)

Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri de ksantin oksidazdır (XO). Oksijensizliğe bağlı olarak ADP'nin ATP'ye fosforilasyonunun azaldığı durumlarda (iskemi durumlarında) ADP yıkılır ve pürin bazı, ksantin oksidazın bir oksidaz olarak etkili olmasıyla hipoksantine dönüştürülür. Ksantin oksidazın oksidaz olarak aktivite göstermesi durumunda hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken moleküler oksijen kullanılmakta, moleküler oksijen  $O_2^-$  anyonuna indirgenmektedir. Süperoksit anyonu  $H_2O_2$  ve  $OH^-$  radikallerinin sentezinde önemlidir (Valko ve ark 2004).

### 3.7.2. Brusellozda antioksidan sistem

Hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi moleküllerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma sistemi denir (Halliwell 1991, Powell 2000). Hücre içi savunma sisteminin önemli enzimatik antioksidanları süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px)'dir (Mates ve ark 1999). Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanlar arasında vitaminler (vitamin E, vitamin C, karotinoidler), glutatyon (GSH), doğal flavonoidler, melatonin ve diğer bazı moleküller bulunur (McCall ve Frei 1999).

SOD, süperoksit radikalının hidrojen peroksit dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir (McIntyre ve ark 1999). SOD hücresel kompartmanlardaki  $O_2^-$  düzeylerini kontrol altında tutar ve ayrıca fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar (Landis ve Tower 2005).



Katalaz hücrede oluşan  $H_2O_2$ 'yi  $OH^-$  oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır.  $H_2O_2$ 'yi suya ve oksijene dönüştürür (McIntyre ve ark 1999). SOD ve CAT *Brucella* etkenleri tarafından eksprese edilmeleri dolayısıyla antibakteriyel etkili serbest oksijen ve azot radikallerinin ortamdaki uzaklaştırılması sebebiyle brusellozda önemlidir.



Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) hücre içi hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir (Armstrong 1998). Redükte glutasyonu yükseltgerken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de suya çevirerek methemoglobin oluşumunu engeller ve membran lipidlerini peroksit anyonuna karşı koruyarak hücre membranının bütünlüğünü ve hemoglobini oksidan strese karşı korur (Akkuş ve ark 1996).

Glutasyon önemli bir intrasellüler antioksidandır. Hücre içerisinde indirgen formda (GSH) bulunur. Endojen üretilen peroksidlere karşı okside olarak onları indirger. Glutasyon peroksidaz bu reaksiyonu katalizler. Glutasyon etkin olarak hücreyi koruyabilmesi için büyük kısmı redükte halde tutulmalıdır. Bu reaksiyonu da glutasyon redüktaz katalizler (Cherubini ve ark 2005). Okside şekli, serbest radikallerin inhibisyonuna, indirgenmiş sülfidril gruplarının stabilizasyonunda ve tokaferol ile askorbatın rejenerasyonunda görevlidir (Armstrong 1998).



Nötrofil ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde Fe-Hem içeren antibakteriyel savunma mekanizmalarından biri de myeloperoksidaz (MPO) enzimidir. Myeloperoksidaz fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynamaktadır. MPO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birlikte antibakteriyel etki (oksijene bağlı) göstermektedir. Çeşitli uyarıcıların etkisiyle fagositler MPO içeren granüllerini ekstrasellüler aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltırlar. Myeloperoksidaz, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek hipoklorik asit (HOCl), hipoyodik asit (HOI) ve hipobromik asit (HOBr) oluşturur. Bu bileşikler ve tuzları güçlü oksidanlardır, biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerek mikroorganizmayı etkileyen toksik ajanlar meydana getirirler (Hampton ve ark 1998, Klebanoff 1999).

### 3.8. *Brucella* Enfeksiyonlarında Sitokinlerin Rolü

İmmünolojik olaylar ve yangı sırasında çeşitli hücreler tarafından üretilen, birçok fizyolojik cevapta rol oynayan küçük polipeptid moleküllere sitokin adı verilir (Nororiha ve ark 1995). Hücre gelişmesi, çoğalması, aktivasyonu, yangı, bağışıklık, doku tamiri ve morfogenezis gibi önemli biyolojik faaliyetleri düzenlerler. Monosit/makrofajlar tarafından salınan sitokinlere monokin, lenfositler tarafından salınan sitokinlere lenfokin, bir lökositte salınan ve diğer lökositlere etki eden sitokinlere interlökin (IL) denilmektedir. İnterlökin, interferon (IFN) ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi sitokinler konak hücrenin antijenlere karşı reaksiyonlarını, lökosit ve bazı hücrelerin gelişmesini, hareketini ve farklılaşmasını sağlayan immünomodülatör moleküllerdir. Sitokinler etkilerini ancak hücre üzerindeki reseptörlerine bağlandıklarında gösterebilirler (Abbas ve ark 1994).

Makrofajlar tarafından fagosite edilen Gram negatif *Brucella* etkenlerine ait lipopolisakkaritler bazı canlılarda makrofajları aktive ederek IL-1, IL-12 ve TNF- $\alpha$  gibi monokinlerin salınmasına neden olur (Dornand ve ark 2002). Ancak insanlarda *Brucella* enfeksiyonları yangısal sitokinlerden TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve interlökin (IL-1 $\beta$ ) sentezini uyarmaz. Makrofaj aktive edici ve koruyucu bir sitokin olan IFN- $\gamma$  'nın bazı hastalarda üretimine karşın makrofaj aktive edici fonksiyonunda bir defektin sözkonusu olduğu düşünülmektedir (Chugh ve ark 2001). Bruselloz hastalığında yangı uyarıcı (pro-inflamatuar) mediatörler ve oksidatif sistem ile apoptotik olayların aktive edilmemesi, etkenlerin vücutta kolayca yerleşip çoğalmasına olanak sağlar. Bunun sonucu tedavi güçleşir ve bazı vakalarda ise tekrarlayan enfeksiyonlar görülür.

## 4. MATERYAL VE METOT

Bu araştırmada insan hücre hatlarından U937 monositler kullanıldı. Makrofajlara dönüştürülen hücreler *B. melitensis* ile enfekte edilerek cisplatinin (20 µM) yangı, oksidatif stres ve hücre viabilitesi üzerine etkileri araştırıldı.

### 4.1. Hücre Kültürü

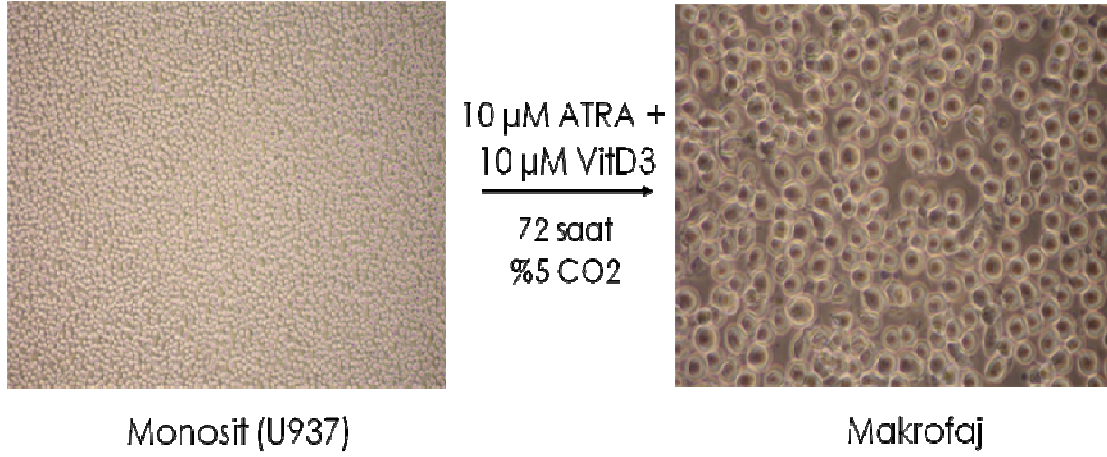
Araştırmada kullanılan insan monositik hücre hattı (U937) Prof. Dr. Miles D. Houslay'den temin edildi (Glasgow Üniversitesi, Glasgow/UK). U937, *Brucella* enfeksiyon modeli olmak üzere birçok çalışmada araştırma materyali olarak kullanılmaktadır (Caron ve ark 1994, Groos ve ark 2004, Shepherd ve ark 2004). Bu hücrelerin besi ortamı olan flasklarda çoğaltılması, makrofajlara dönüştürülmesi, *B. melitensis* ile enfekte edilmesi ve cisplatin ile tedavi şekli aşağıda verildiğı gibi yapıldı.

### 4.2. Hücre Pasajı

Monositik hücreler % 10 oranında inaktif edilmiş fetal sığır serumu (FBS) (Sigma), 1 mM sodyum piruvat (Gibco), 1.5 g/l sodyum bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) (Gibco), 10 mM HEPES (Gibco), 5 mM glutamin (Sigma), 4.5 g/l glikoz ve 100 IU/ml penisilin/streptomisin (Sigma) içeren RPMI 1640 (Gibco) besi medyumunda (tam besi yeri) 37 °C, % 5 CO<sub>2</sub> ve % 95 hava bulunduran steril etüvde inkübe edildi (Heraus Heracell 150). Hücrelerin çoğaltılması için yaklaşık 1x10<sup>6</sup>/ml sayıda hücre 40 ml medyum bulunan 75 cm<sup>2</sup> steril kültür kabına (flask) konarak üç gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Besi ortamındaki hücrelerin yoğunluğuna göre 3-4 günde bir kez 1/5 oranında pasajları yapıldı. İhtiyaç durumunda süspansiyonlar steril kapaklı tüplere aktarılarak 400 g ve oda ısısında 5 dakika süreyle santrifüj ile tortu elde edildi. Hücre sayısı tripan mavisi ile hemositometrede mikroskop altında belirlendi.

### 4.3. Makrofaj Dönüşümü

*B. melitensis* enfeksiyonu için kullanılan U937 monositik hücrelerin makrofajlara dönüştürülmesi, çoğalmakta olan hücre süspansiyonu üzerine 10<sup>-7</sup> M konsantrasyonda retinoik asit (All-trans RA) (Sigma) ve vitamin D<sub>3</sub> (1.25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub>) (Sigma) ilave edilmesi ile yapıldı. Hücreler 12 kuyucuklu plastik hücre kültürü flasklarına (Costar) dağıtılarak 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda hücrelerin büyük çoğunluğunun flask tabanına yapıştığı ve monositlerin makrofajlara farklılaşmanın tamamlandığı görüldü (Şekil 4.1) (Caron ve ark 1994).



Şekil 4.1. Monosit (U937)'nin makrofaja dönüşümü

#### 4.4. *Brucella* Enfeksiyonu Oluşturma

Araştırmada kullanılan *Brucella* (M 16 suşu) etkenleri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'den temin edildi. Etkenlerin hazırlanışı: log fazında bulunan *B.melitensis* kültürünün seri sulandırmaları yapıldıktan sonra katı besi yerlerine ekim yapılmış mililitredeki bakteri sayısı belirlendi. Süspansiyonun santrifüjü ve RPMI medyum ile birkaç kez yıkanmasını takiben 100 µl alındı ve bakteri/hücre oranı yaklaşık 20:1 olacak şekilde yukarıda hazırlanışı verilen makrofaj kültürüne ilave edildi. Etkenlerin makrofajlar tarafından fagosite edilmeleri için flasklar etüvde 30 dakika süre ile inkübe edildi, daha sonra fosfat bafır (PBS) ile üç kez yıkandı (Gross ve ark 1998, 2004). Makrofaj dışında kalan bakterilerin ortamdaki kaldırılması için hücreler gentamisin (30 µg/ml, Gibco) içeren taze besi yeri ile 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu miktardaki gentamisinin makrofaj dışı bakterileri öldürdüğü ancak hücre içi *Brucella* etkenlerine etkisi olmadığı daha önce gösterilmiştir (Caron ve ark 1994, Gross ve ark 2003). Bu aşama kültürün başlangıcı (sıfırinci saat) kabul edildi ve 1, 24, 48. saatlerde (bazı çalışmalarda 6. saat) süpernatantlar toplandı; hücrelerin bir kısmı viabilite kontrolleri, homojenat ve RNA izolasyonu için kullanıldı.

#### 4.5. Cisplatin Uygulaması

İnsanlarda kemoterapötik amaçlı kullanılan cisplatin (Sigma) araştırmada 20 µM dozda kullanıldı. Bu konsantrasyon nekrotik dozun çok altında olup, literatürde kullanılan



tedavi dozları ile uyumludur (Ikeguchi ve ark 2002). RPMI medyum içinde hazırlanan stok solüsyon kullanılıncaya kadar -20°C’de tutuldu.

#### **4.6. Homojenat Hazırlama**

İnkübasyon sonrası hücreleri yapışmış oldukları hücre kültürü zemininden kaldırmak için 75 cm<sup>2</sup> flasklara 1ml tripsin (% 0.25) (Sigma), 12 kuyucuklu flasklara ise 100 µl tripsin solüsyonu eklenerek 1-2 dakika beklendi. Daha sonra flasklar hafif çırpma hareketi ile hücrelerin serbest kalmaları sağlandı. Süspansiyon hücreler pipet ile toplanarak kapaklı tüp içerisinde (veya eppendorflarda) ve oda ısısında 400 g devirde 5 dakika süreyle santrifüj edilerek hücre pelletleri elde edildi. Homojenat hazırlanırken PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra tekrar santrifüj edildi ve üzerine hücre lizis bafırı konuldu. Lizis bafır şü karışımdan oluştu: % 1 Triton X-100 (Merck) (v/v), 50 mM HEPES pH 7.2, 10 mM EDTA, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . 2H<sub>2</sub>O ve % 8 oranında proteaz inhibitör kokteyli (aprotinin, fenilmetansülfonilflorid (PMSF), leupeptin, sodyum florid (NaF) (Merck, Sigma). Deterjanda çözünmeyen hücresel proteinler 12 000 g, 4 °C’de 10 dakika süreyle santrifüj ile çöktürülerek süpernatantlar elde edildi. Süpernatantların protein düzeyleri Bradford metodu ile yapıldı. MTT testi için 12 kuyucuklu flasklarda hücreler üzerine reaktifler konularak çalışıldı.

Her setlik çalışmada gruplarda aynı pasajdan elde edilen hücreler kullanıldı. Araştırmanın her aşamasında dezenfeksiyon ve sterilizasyona azami özen gösterildi. Her deney en az 3 tekrardan ve triplike olarak yapıldı ve elde edilen ortalama değerler SPSS istatistik programında değerlendirildi.

#### **4.7. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini**

Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahip olduğundan protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ( $\lambda_{max}$  =465nm) ve mavi ( $\lambda_{max}$  =595nm) formu mevcuttur. Protein bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Deney şu şekilde uygulandı: kültür homojenatlarından 20 µl alınarak üzerine 200 µl Bradford ayırıcı (Sigma) ve 580 µl su ilave edildi. Oda ısısında 10 dakika bekletildikten sonra, absorbans spektrofotometrede (UV mini-1240 Shimadzu) 595 nm’de ölçüldü. Standartlar yardımıyla örneklerin protein düzeyleri hesaplandı (Bradford 1976).

#### 4.8. Tripan Mavisi ile Canlı-Ölü Değerlendirmesi

Tripan mavisi ile ölü hücreler boyanırken canlı hücreler boyanmaz. Seyreltilmiş hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak üzerine aynı miktarda tripan mavisi (PBS’de hazırlanmış) solüsyonu eklendi ve bir eppendorf tüp içinde karıştırıldı. Hemositometre lamının (Neubauer Assistent) her iki bölümüne birer damla karışımdan damlatıldı. Lam üzerinde bulunan dört karedeki hücreler invert mikroskobu (Olympus CKX41) altında sayıldı her bir karedeki ortalama sayıyı belirlemek için 4’e bölündü. Bu sonuç hücre sayısı  $\times 10^4$  olarak ifade edildi. Bu da 2 ile (seyreltme faktörü) çarpılarak mililitre süspansiyonda bulunan canlı hücre sayısı elde edildi. Görüntüler özel ataçmanlı dijital fotoğraf makinesi (Olympus C-7070) ile fotoğraflandı.

#### 4.9. MTT Viabilite Testi

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) kullanılarak bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlıklı hücrelerde mitokondrial redüktazlar tarafından MTT’nin tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (McGahon ve ark 1995). Bu reaksiyon mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Ayrıntılı deney basamakları:

1. MTT (Fluka) 10 ml hacimde PBS içinde çözülerek 5 mg/ml konsantrasyonda stok solüsyonu steril ve karanlık ortamda hazırlanarak 0.22 µm filtre (Millipore) de süzüldü. Bu solüsyon karanlık ortamda ve 4 °C ısıda bir ay saklanabilmektedir. Bu stok solüsyondan 1:10 oranında çalışma solüsyonu hazırlandı.
2. Her bir inkübasyon süresi sonunda çalışmanın yapıldığı 12 kuyucuklu flasklar üzerinden medyumları alınarak 1 ml/kuyucuk olacak şekilde MTT çalışma solüsyonu eklendi.
3. Kültür % 5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C’de 2 saat süreyle inkübe edildi.
4. Daha sonra kuyucukların üzerindeki çalışma solüsyonları uzaklaştırıldı ve formazan kristallerini çözünür duruma getirmek için solubilizasyon (0.04 N HCl, izoprapanol) solüsyonundan kuyucuklara 1’er ml hacimde eklendi.
5. Otomatik pipet yardımıyla formazon kristallerinin iyice çözünmesi sağlandıktan sonra eppendorf tüplere alınarak soğutuculu santrifüjde 10000 g’de 2d süreyle santrifüj edildi.

6. Elde edilen renkli süpernatant yeni tüplere aktarıldıktan sonra spektrofotometrede 570 nm de absorbansları ölçülerek değerlendirildi. Canlı hücre sayısının fazla olduğu kuyucuklarda absorbansın daha yüksek olduğu saptandı.

#### **4.10. Malondialdehit (MDA) Analizi**

Hücre kültürü medyumlarında MDA tayini Yoshiko ve ark (1979) tarafından modifiye edilen yöntemle göre spektrofotometrik olarak yapıldı. Bu yöntem lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiyobarbitirik asidin (TBA, Merck) reaksiyonu temeline dayanmaktadır. MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturur, bu çözeltinin absorbansı 535 nm'de spektrofotometrede ölçülerek lipid peroksidasyonunun derecesi saptandı. Standart çalışması ile test sonuçları değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar  $\mu\text{mol}$  cinsinden verildi.

#### **4.11. Nitrik Oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi**

Hücre kültür medyumları NO düzeylerinin ölçümünde bu molekülün yarı ömrünün çok kısa olması nedeni ile nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) konsantrasyonlarının saptanmasıyla hesaplandı. Bu amaçla Griess metodu (Cortas ve Wakid 1990) kullanıldı. Total NO miktarı, aktifleştirilmiş kadmiyum granüllerinin nitratı nitrite dönüştürmesinden sonra spektrofotometrede 545 nm dalga boyunda ölçülerek bulundu. Elde edilen veriler  $\mu\text{mol/L}$  cinsinden verildi.

#### **4.12. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini**

Kontrol ve enfekte kültür homojenatlarında GSH-Px aktivitesi Paglia ve Valentine (1967) belirlediği yöntemle ticari kit (Randox-Ransel 505) kullanılarak yapıldı. Deneyin prensibi GSH-Px'in cumenehidroperoksit ile glutasyonun oksidasyonu esasına dayanır. Bu metotta  $\text{H}_2\text{O}_2$  varlığında GSH-Px'in oluşturduğu okside glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile redükte glutatyona (GSH) indirgenir. NADPH'ın  $\text{NADP}^{+}$ ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de tespit edilmesiyle GSH-Px aktivitesi U/g protein şeklinde hesaplandı.

#### **4.13. Glutasyon (GSH) Analizi**

İndirgenmiş glutasyon (GSH) düzeylerinin ölçümü Sedlak ve Lindsay (1968) tarafından geliştirilen spektrofotometrik yönteme göre gerçekleştirildi. Bu yöntemin prensibi, reaksiyon ortamına ilave edilen 5.5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)'in sülfidril grupları tarafından indirgenmesi sonucu, 1 mol s lfhidrile karşılık 1 mol 2-nitro-5-merkaptobenzoik asit oluşumuna dayanmaktadır. Hücre homojenatından 0.2 ml alınarak 10 ml'lik test tüpüne konuldu ve üzerine 1.8 ml distile su ilave edilerek iyice karştırıldı. Presipitasyon solüsyonunun 3 ml'si hızlıca üzerine eklendi. 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra kalın dereceli filtre kağıtlarından filtre edildi. Spektrofotometrede 4 dakika içerisinde ve 412 nm'de ölçümü yapıldı. Elde edilen değerler  mol/mg protein şeklinde hesaplandı.

#### **4.14. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini**

Hücre homojenatlarında katalaz aktivite tayini Aebi (1984)'ye göre yapıldı. Bu analizin prensibi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ışık spektrumunun ultraviyole dalga boyunun azalmasıyla artan bir absorbanı vermesi esasına dayanır. Uygun bir tampon içinde bulunan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin numunede bulunan katalaz etkisiyle yıkılması sonucu 240 nm'de absorbanıta azalma görülür. Absorbanıta gözlenen azalma hızı katalaz aktivitesi ile doğru orantılıdır. Elde edilen değerlerden yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen veriler k/g protein türünden verildi.

#### **4.15. Ksantin Oksidaz (XO) Aktivitesi Tayini**

Ksantin oksidaz deneyi hücre kültür homojenatlarında Prajda ve Weber (1975)'in geliştirdiği yönteme göre çalışıldı. Bu yöntem; numunede bulunduğu kabul edilen ksantin oksidazın ortamdaki ksantinden ürik asit oluşturması prensibine dayanır. Oluşan  rik asit miktarı % 100'l k triklorasetikasit (TCA) (Merck) solüsyonun eklenmesi ile sabitlenir. Özetle, deneyde kullanılan k r ve numune tüpleri üzerine 50  l ksantin (Sigma) ve 2.8 ml fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) konulup sadece numune tüplerine 150  l örnek eklenerek su banyosunda 37 C de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra k r tüplerine de 150'şer  l örnek eklendi ve reaksiyon 100  l TCA solüsyonu eklenerek sonlandırıldı. Tüpler 4000 g'de, oda ısısında 30 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantların absorbanları 293 nm'de ölçüldü. Sonuçlar U/g protein olarak verildi.

#### **4.16. Myeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Tayini**

Myeloperoksidaz deneyi hücre kültür homojenatlarında Suzuki ve ark (1983) tarafından geliştirilen yöntemle göre çalışıldı. Analiz için 1.6 mM tetrametilbenzidin (TMB), 80 mM sodyum fosfat bafır (pH 5.4) ve sodyum fosfat bafır içerisinde hazırlanmış 0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi kullanıldı. 5 ml'lik test tüpüne 2.1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.6 ml PBS ve 100 µl TMB içeren reaksiyon karışımı konuldu. Bunun üzerine 200 µl homojenat eklendi ve 655 nm'de 1 dakika arayla 4 ölçüm yapıldıktan sonra aradaki fark U/mg protein olarak ifade edildi.

#### **4.17. TNF- $\alpha$ ve IL-12 Düzeyinin Belirlenmesi**

Hücre kültür mediyumlarında TNF- $\alpha$  ve IL-12 deneyleri ticari kitler (BIOSOURCE/USA) kullanılarak ELISA (Enzim bağlı immün assay) yöntemi ile yapıldı. ELISA pleytlerinde insan TNF- $\alpha$  ve IL-12'ye spesifik poliklonal antikorlarla kaplı kuyucuklara konsantrasyonu bilinen TNF- $\alpha$  ve IL-12 standartları ve kültür süpernatantları konuldu. Birinci inkübasyon süresince TNF- $\alpha$  ve IL-12 antijenleri ve biyotinle işaretlenmiş antikorlar eş zamanlı olarak inkübe edilip ilk yıkamadan sonra streptavidin peroksidaz enzimi eklendi. Bağlanmayan enzim ikinci inkübasyon ve yıkamadan sonra ayrıştırıldı. Daha sonra, substrat solusyonu renk reaksiyonu oluşturmak için eklendi. IL-12 ve TNF- $\alpha$  bulunan örneklerde yoğunluğa bağlı olarak renk değişimi gözlemlendi. Örnekler ELISA okuyucusunda (Seac-Sirios) 450 nm dalga boyunda okundu ve standart yardımıyla hesaplama yapıp sonuçlar pg/ml cinsinden verildi.

#### **4.18. RNA İzolasyonu**

RNA eldesi için yaklaşık  $1 \times 10^7$  sayıda hücre 1.5 ml hacimli steril eppendorflar içerisine alınıp, üzerine 1ml RNA izolasyon reaktifi (TriReagent, Sigma) konuldu ve vortekle karıştırıldı. Homojenat oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra 12000 g, 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Açık renkli süpernatant temiz bir tüpe aktarılarak oda ısısında 5 dakika bekletildi ve üzerine 0.2 ml kloroform ilave edilip 15 saniye süreyle vortekste karıştırıldı. Oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra örnekler 12 000 g, 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç faz oluştu. Üsteki renksiz faz (RNA içerir) yeni bir eppendorf tüpe alınıp, üzerine 0.5 ml izoprapanol (Merck) ilave edildi. Oda ısısında 5-10 dakika süreyle tutulduktan sonra 12 000 g 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Pelet üzerindeki süpernatant alınıp RNA % 75'lik etil alkol ile yıkandı. Vorteksenip, 7 500 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra RNA 5-10 dakika süreyle

havada kurutuldu. RNA peleti üzerine 100 µl su (DEPC-dietilpirokarbonatlı su) ilave edilip birkaç kez pipetlenerek çözünmesi sağlandı. Total RNA miktarı ve saflığı spektrofotometrede (OD<sub>260</sub> ve OD<sub>280</sub> nm'de) belirlendi. RNA/DNA oranı 1.7 ve üzeri olanlar saflığı yüksek kabul edilip cDNA (komplementer DNA) sentezinde kullanıldı.

#### 4.19. cDNA Sentezi ve PCR Reaksiyonu

Elde edilen total RNA'dan cDNA sentezi (Fermentas ticari kiti kullanılarak) şu şekilde yapıldı; otoklav edilmiş 0.5 ml eppentorf tüplere 1-3 µg total RNA, 1 µl oligo(dT)<sub>18</sub> primer konulup 12 µl'ye DEPC uygulanmış su ile tamamlandı. Karışım 3-5 saniye 13 000 g'de santrifüj edilip termal saykılarda (Stratagene MX3005) 70 °C'de 5 dakika tutuldu. Süre sonunda karışım buz içinde soğutuldu. Tüpün üzerine 5x reaksiyon bafır, ribolock ribonükleaz inhibitör (20 u/µl ), 10 µl dNTP karışımı konulup karıştırıldı ve kısa süreli santrifüj edildi ve termal saykılarda 37 °C'de 5 dakika tutuldu. Tüplere 1 µl revertAid m-mulv reverz transkriptaz ilave edildi. Termal saykılarda 42 °C'de 60 dakika süre ile RNA cDNA' ya dönüştürüldü. cDNA sentezinin tamamlanması için tüpler 70 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra PCR kullanımına hazır hale getirildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi, genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş bir bölgenin *in vitro* şartlar altında oligonükleotid primer ve *Taq* polimeraz enzim kullanılarak bir otomatik termalsaykıl yardımcıyla çoğaltılma metodudur. PCR reaksiyonunda birinci döngü denatürasyon, ikincisi primer yapışması (annealing) ve üçüncü döngü zincir uzaması (extention) olmak üzere üç basamaktan oluşur. Döngü sayısı 30-40 arasında değişir. PCR reaksiyonu için örneklerden hazırlanan cDNA'lardan 2 µl alındı, üzerine 0.5 U DNA *Taq* polimeraz içeren Syber Green PCR mastermiks ve her bir reaksiyona spesifik bir çift primer (oligonükleotid) ilave edildi. Reaksiyonda 100 ng düzeyinde iNOS, TNF-α ve IL-12 spesifik primer literatürde belirtilen baz dizgeleri sentezi yapılarak kullanıldı (Tablo 1). DNA amplifikasyonu PCR yöntemi ile anlık PCR sistemi kullanılarak yapıldı. Real-Time PCR sonuçları MxPro programı kullanılarak gruptaki her bir genin ortalama CT (eşik siklus) değerleri hesaplandı. Daha sonra kontrol ve test grupları arasındaki farklar hesaplandı. Transkripsiyon değerleri β-aktin genlerinden elde edilen sonuçlar ile normalize edildi. Reaksiyonda kullanılan primer dizgeleri ve çalışma ortamları Tablo 1'de verildi.

#### **4.20. İstatistiksel Metot**

Araştırmada elde edilen veriler, SPSS 9.05 (Statistical Package for Social Sciences) programında, One-way ANOVA varyans analizi yöntemi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Duncan testi ile belirlendi.  $p < 0.05$  ve altı istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Tablo 1. PCR m-RNA transkripsiyon analizinde kullanılan primerler ve reaksiyon ortamları.

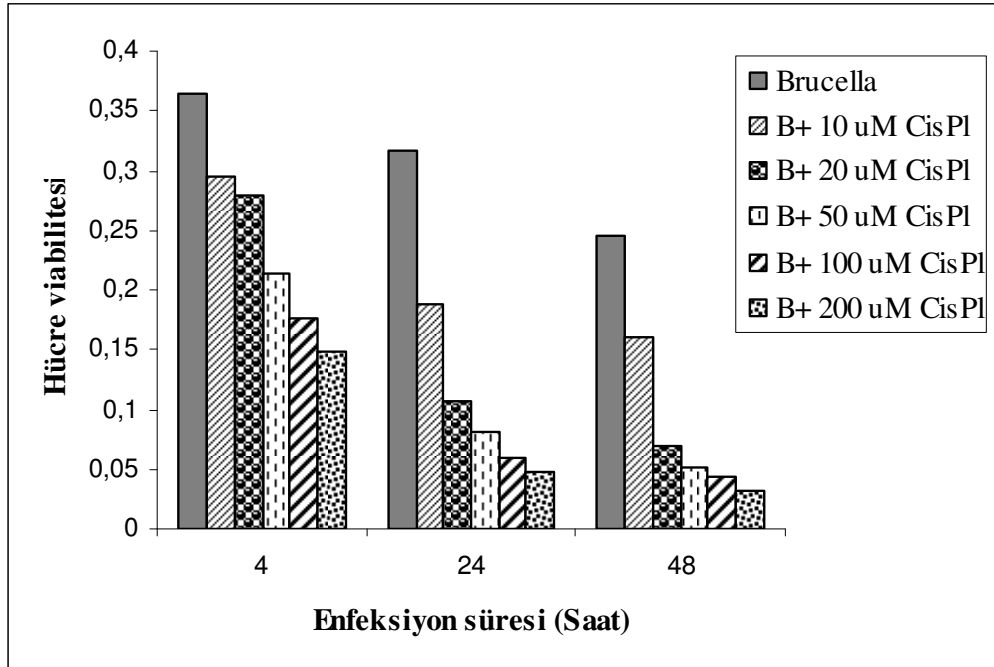
	<b>Sense (ileri) primer dizgesi</b>	<b>Antisens (geri) primer dizgesi</b>	<b>Reaksiyon ortamı</b>	<b>Ürün</b>
<b>hTNF-<math>\alpha</math></b>	CAG AGG GAA GAG TTC CCC AG	CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG	94°C 45s, 60°C 60s, 72°C 90s, 35 siklus.	325 bp
<b>IL-12 p40</b>	CCA AGA ACT TGC AGC TGA AG	TGG GTC TAT TCC GTT GTG TC	95°C 35s, 56°C 60s, 72°C 60s, 30 siklus.	354 bp
<b>iNOS</b>	GGC CTC GCT CTG GAA AGA	TCC ATG CAG ACA ACC TT	95°C 35s, 56°C 60s, 72°C 60s, 30 siklus.	499 bp
<b><math>\beta</math>-aktin</b>	CAT CGT CAC CAA CTG GGA CGA C	CGT GGC CAT CTC TTG CTC GAA G	95°C 30s, 55°C 45s, 72°C 60s, 30 siklus.	466 bp



## 5. BULGULAR

### 5.1. Farklı Dozlardaki Cisplatinin Hücre Viabilitesine Etkisi

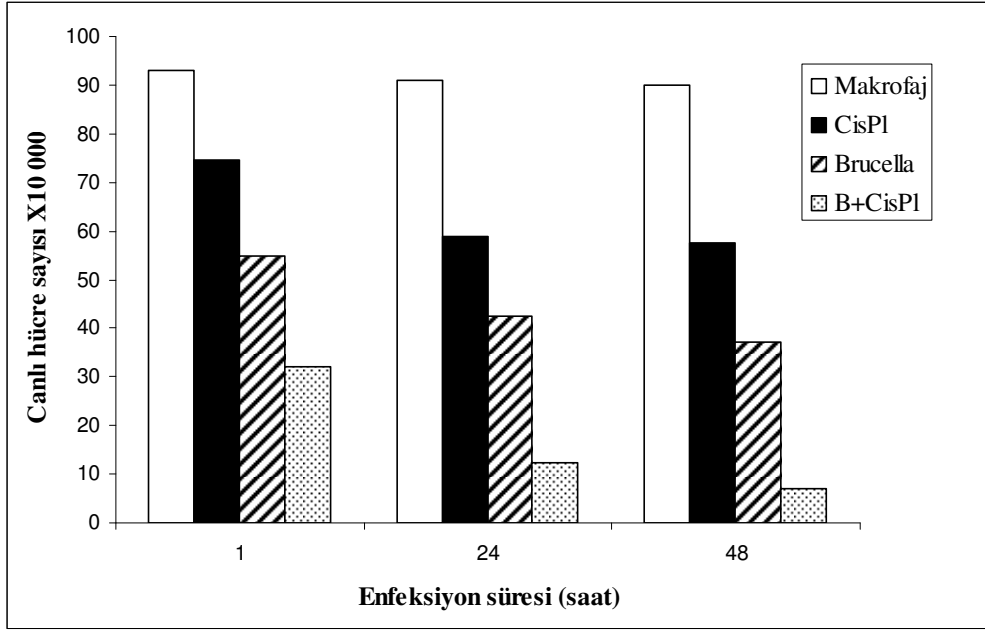
Artan dozlarda cisplatinin *Brucella* enfekte makrofajlarda hücre viabilitesi üzerine etkisi zamana bağlı olarak değerlendirildi. Enfeksiyonun 48. saatinde 20  $\mu$ M cisplatin ile 200  $\mu$ M cisplatin dozunun benzer etki ile enfekte hücrelerin % 80'inden fazlasını öldürdüğü saptandı.



Şekil 5.1. 10-200  $\mu$ M dozlarda cisplatin uygulamasının enfekte makrofajlarda hücre viabilitesine etkisi. Viabilite kontrolleri MTT testi ile yapıldı. B: *B. melitensis* enfekte makrofajlar, CisPl: cisplatin, uM:  $\mu$ M.

## 5.2. Cisplatin Uygulamasının Enfekte Hücre Sayısına Etkisi

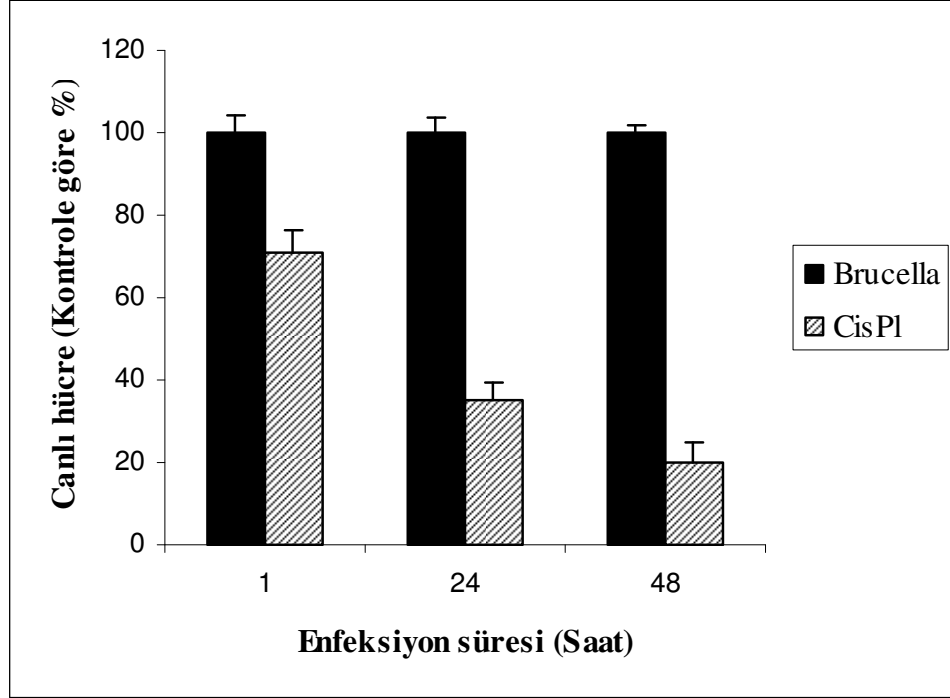
*B.melitensis* ile enfekte edilen makrofajlar farklı inkübasyon süreleri sonunda kuyucuklardaki tripan mavisi kullanılarak canlı hücreler sayıldı. Hücre sayımı seyreltilmiş süspansiyondan 20 µl alınarak üzerine aynı miktarda tripan mavisi eklenerek boyanmasını takiben hemositometre kullanılarak invert mikroskop altında yapıldı. Cisplatin enfekte edilmemiş makrofajların sayısında yaklaşık % 20-35 oranında bir azalmaya sebep olduğu gözlemlendi. *B.melitensis* ile enfekte makrofajlarda enfeksiyonun 24. saatinde yaklaşık % 70, 48 saatlik inkübasyon periyodunun sonunda ise hücre sayısında % 80 kadar bir azalmaya neden olduğu tespit edildi.



Şekil 5.2. *B. melitensis* ile enfekte makrofajlarda cisplatin tedavisinin hücre sayısına etkisi. Makrofaj: enfekte edilmemiş hücreler, CisPl: 20 µM cisplatin, *Brucella*: *B. melitensis* ile enfekte, B+Cispl: *B. melitensis* enfekte makrofajlara 20 µM cisplatin uygulanmış grup. En az 4 farklı çalışmadan seçilen bir örnek.

### 5.3. Spektrofotometrik Yöntemle Viabilite Testi

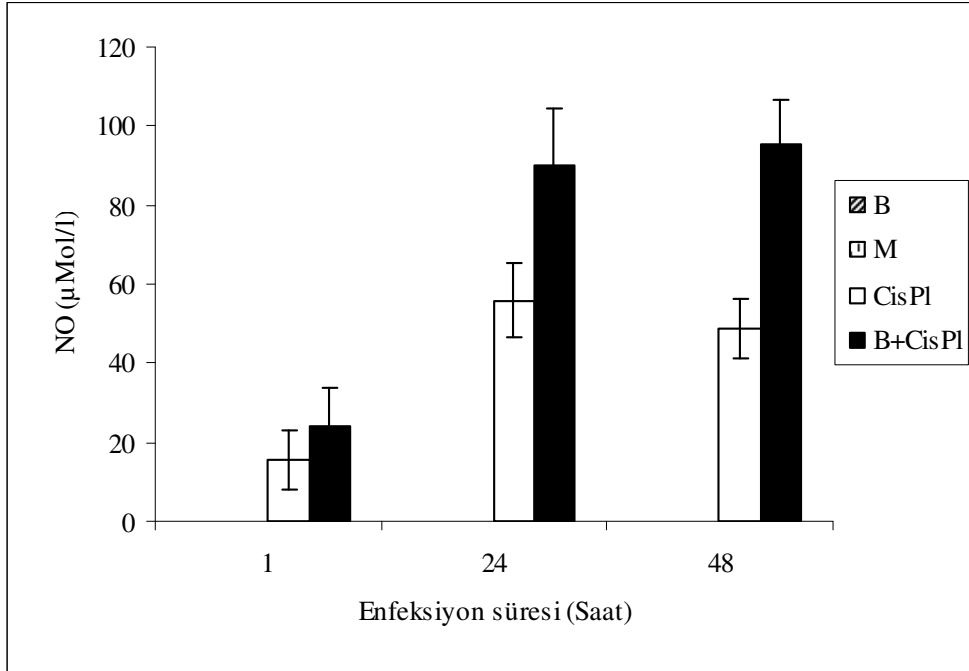
Enfekte makrofajlarda bruselloz modelinde hücre viabilitesi üzerinde cisplatin etkisi kantitatif yöntemle belirlendi. *Brucella* grubu 100 kabul edilerek farklı sürelerdeki cisplatin etkisi saptandı (Tüm saatlerde *Brucella* ile cisplatin grubu arasında  $p < 0.001$ ).



Şekil 5.3. *B. melitensis* ile enfekte insan makrofajlarına cisplatin (B+CisPl) tedavilerinin hücrelerde viabilite üzerine etkisi. Her bir inkübasyon sonrası kuyucuklarda bulunan hücrelerde MTT testi ile viabilite kontrolü yapıldı (CisPl: *B. melitensis* + 20  $\mu$ M cisplatin).

#### 5.4. Cisplatin Tedavisinin Nitrik Oksit Üretimine Etkisi

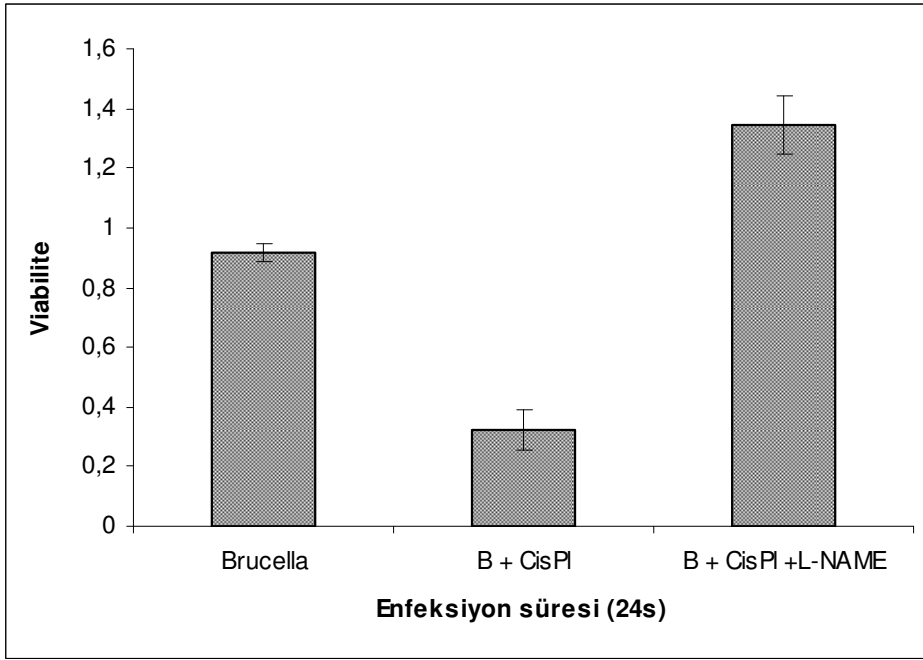
Makrofajlarda (kontrol grubu) ve *B. melitensis* ile enfekte makrofajlarda NO üretimi olmazken, cisplatin tedavisi enfeksiyonun 1. saatinde başlayıp 48 saat süresince yüksek düzeylerde NO salınımına neden oldu ( $p < 0.0001$ : *Brucella* ile B+CisPl tüm saatlerde,  $p < 0.05$ : M+CisPl ile B+CisPl 24. saat,  $p < 0.001$ : M+CisPl ile B+CisPl 48. saat).



Şekil 5.4. *Brucella* enfekte makrofajlarda nitrik oksit üretimi. Enfekte hücreler farklı sürelerde cisplatin (20 µM) ile muamele edilerek kültür süpernatantlarında Griess yöntemi ile NO düzeyleri saptandı. M: enfekte edilmemiş makrofaj, M+Cispl: makrofajlara cisplatin uygulanması, B: *B. melitensis* enfekte, B+CisPl: *B. melitensis* enfekte hücrelere cisplatin ilavesi.

### 5. 5. iNOS İnhibitörü L-NAME'in Viabilite Üzerine Etkisi

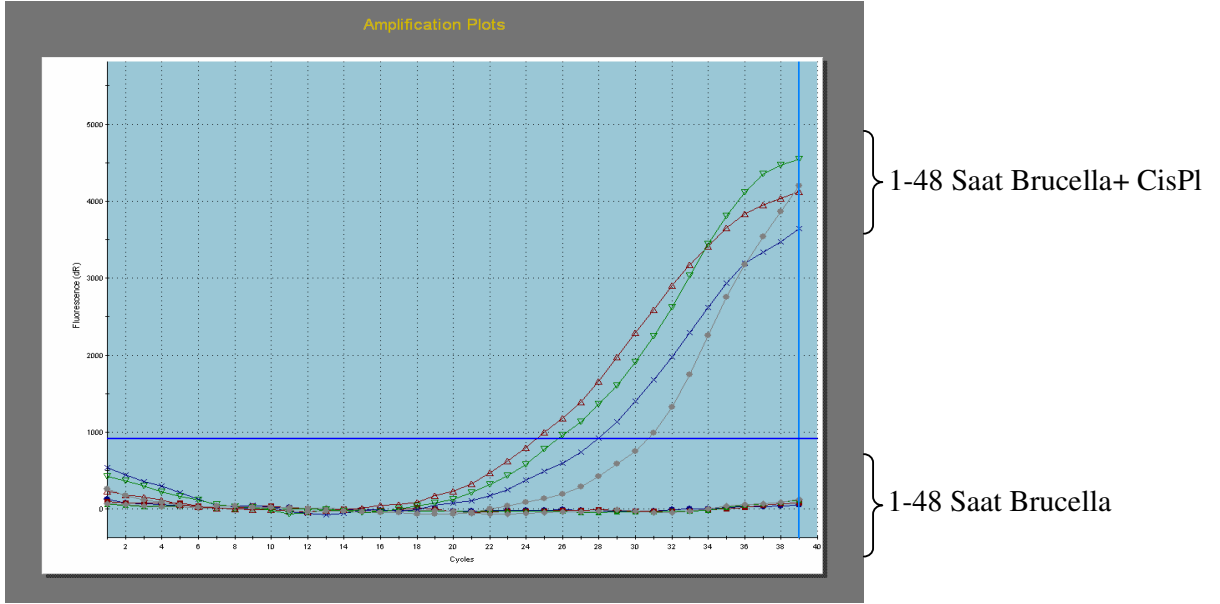
Nitrik oksit bakteriyel enfeksiyonlarda konak tarafından patojene karşı kullanılan önemli bir sitotoksik moleküldür. Cisplatin etkisini ortaya koymak üzere bu kemoteropatik ajanla birlikte iNOS inhibitörü N(G)-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME, Sigma) kullanıldı. Cisplatinin neden olduğu viabilite kaybının L-NAME etkisi ile kaybolduğu saptandı. Tüm gruplar arasında 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda istatistiksel fark  $p < 0.001$ .



Şekil 5.5. iNOS inhibitörü L-NAME'in viabilite üzerine etkisi. NO sentezleyen iNOS inhibitörü L-NAME (200  $\mu$ M) 24 saat süresince *Brucella* ve B+CisPl grubu hücrelere ilave edilerek viabilite üzerine olan etkileri kantitatif olarak MTT testi ile yapıldı.

## 5.6. *Brucella* Enfekte Makrofajlarda iNOS Transkripsiyonu Üzerine Cisplatinin Etkisi

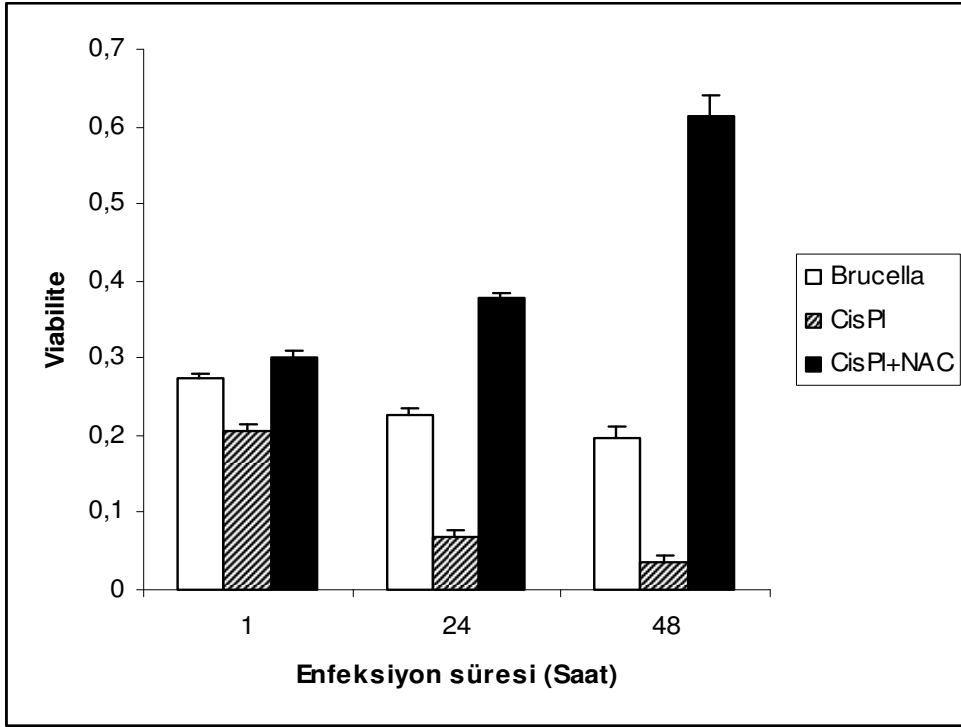
Nitrik oksit üreticisi enzimlerden iNOS mRNA transkripsiyon analizi RT-PCR yöntemi ile yapıldı. Makrofajlar ve *Brucella* enfekte makrofajlarda iNOS mRNA'sı transkribe edilmediği saptandı. Kemoterapötik ajan cisplatinin ise iNOS üzerine belirgin etkisi saptandı.



Şekil 5.6. Real-time RT-PCR yöntemi ile iNOS transkripsiyon analizi. *Brucella* enfekte hücreler farklı sürelerde cisplatin (20  $\mu$ M) ile muamele edilerek total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi sonrası iNOS spesifik primer çifti kullanarak PCR yöntemi ile transkripsiyon analizi yapıldı. *Brucella* enfeksiyonunda iNOS transkripsiyonu indüklenmezken, cisplatin 1, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda iNOS transkripsiyonu uyardığı saptandı.

### 5.7. NAC Uygulamasının Viabilite Üzerine Etkisi

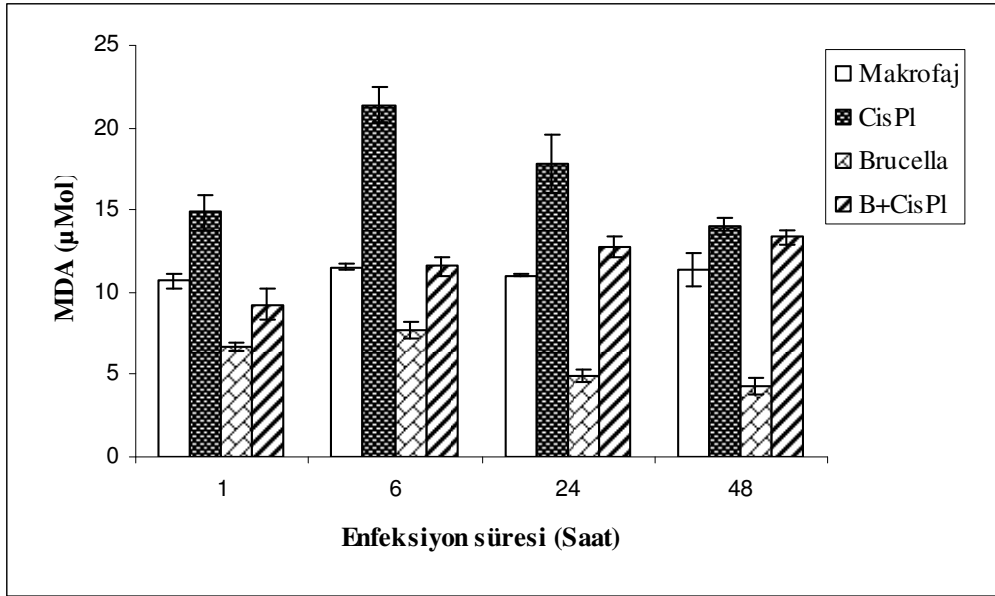
*Brucella* enfeksiyonlarında cisplatinin neden olduğu viabilite kaybı üzerine reaktif oksijen ve azot türlerinin muhtemel etkisinin ortaya konması amacıyla antioksidan N-asetil sistein (NAC, 200 µM) kullanıldı.



Şekil 5.7. Cisplatinin neden olduğu viabilite kaybı üzerine N-asetil sistein'in etkisi. Hücrelere *B. melitensis* ile enfeksiyonu ile birlikte NAC ilave edilerek 48 saat süresince viabilite testleri yapıldı (24-48. saatlerde gruplar arasında:  $p < 0.001$ , 1. saatte cisplatin ile cisplatin+NAC,  $p < 0.05$ ).

## 5.8. Cisplatinin Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkisi

Malondialdehit (MDA) doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan dokulardaki lipid peroksidasyonu son ürünüdür. Enfekte edilmeyen makrofajlarda cisplatin uygulaması 6-24. saatlerde hücre süpernatantlarında MDA düzeyini diğer inkübasyon sürelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdı ( $p < 0.05$ ). *Brucella* enfekte makrofajlarda lipid peroksidasyonunun makrofajlara göre inkübasyon süreleri boyunca azaldığı tespit edildi ( $p < 0.006$ ). Enfekte hücrelere cisplatin tedavisinin, *Brucella* grubuna göre lipid peroksidasyonunu artırdığı belirlendi (1-6. saatlerde  $p < 0.05$ , 24-48. saatlerde  $p < 0.001$ ).

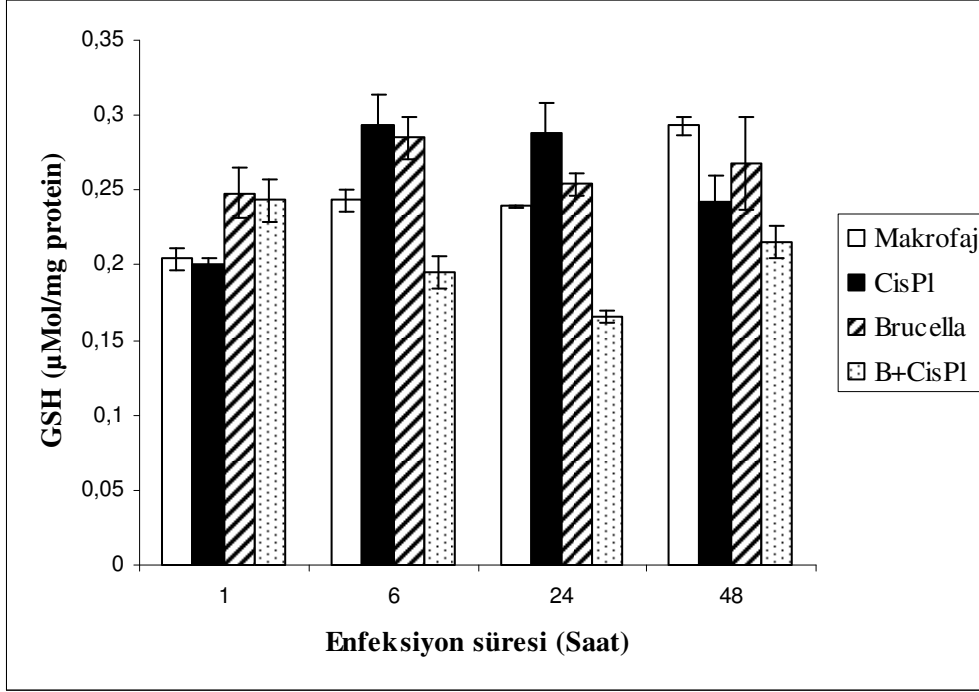


Şekil 5.8. *B. melitensis* ile enfekte makrofajlarda süpernatant MDA düzeyi üzerine cisplatinin etkisi.



### 5.9. Cisplatin Tedavisinde GSH Düzeyleri

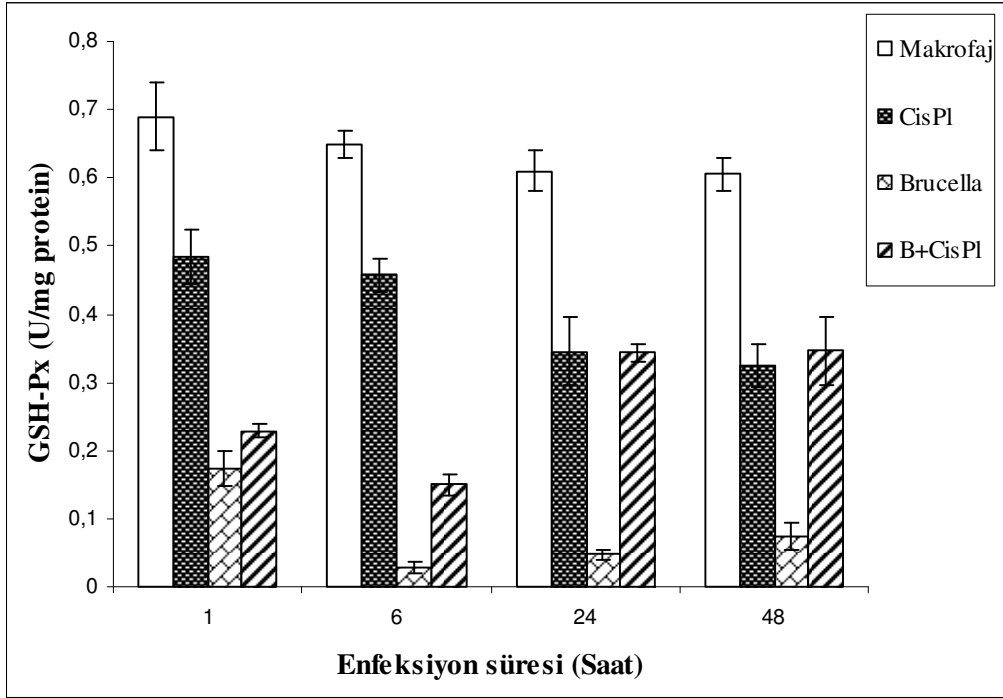
*Brucella* enfeksiyonu süresince hücre içi GSH düzeyinde kontrol grubuna göre önemli bir farkın oluşmadığı gözlemlendi ( $p > 0.05$ ). Ancak cisplatin tedavisinin enfeksiyonun 6. ve 24. saatlerinde GSH seviyesini önemli derecede azalttığı saptandı ( $p < 0.05$ ).



Şekil 5.9. *B. melitensis* ile enfekte makrofajlarda GSH düzeyi üzerine cisplatinin etkisi.

### 5.10. *Brucella* Enfeksiyonunda Cisplatin Tedavisinin GSH-Px Aktivitesi Üzerine Etkisi

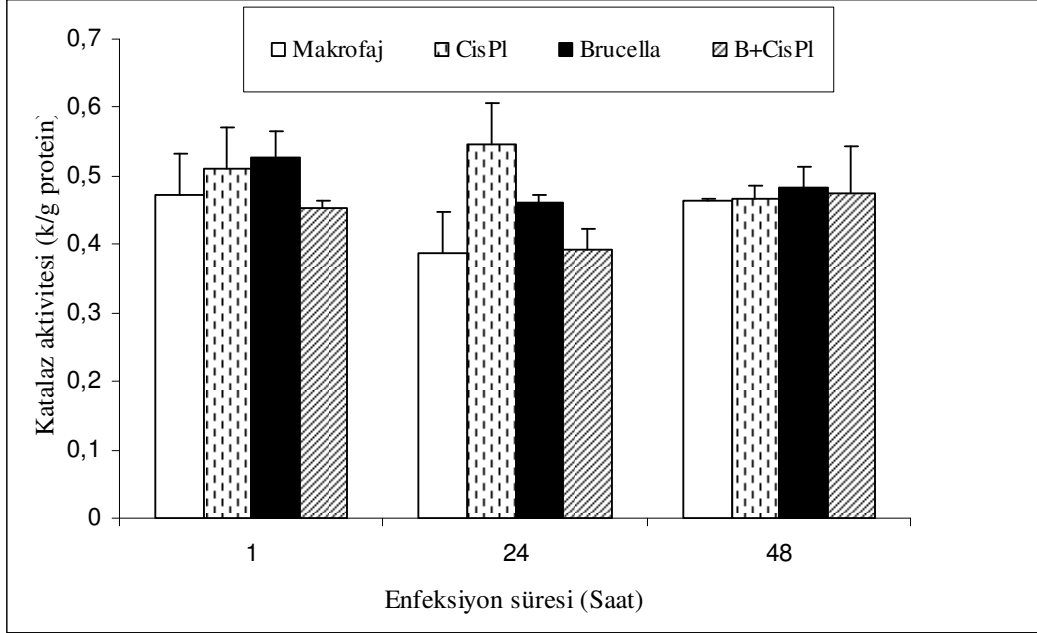
Cisplatin enfekte edilmeyen makrofajlarda inkübasyon süreleri boyunca GSH-Px aktivitesinde istatistiksel bir farka neden olmadı ( $p > 0.05$ ). *Brucella* enfeksiyonunda 6. saat ve sonrası enzim aktivitesinin azaldığı saptandı ( $p < 0.05$ ). *Brucella* enfekte makrofajlarda cisplatin kullanımı GSH-Px aktivitesinde (6-48 saatler) belirgin bir artışa neden oldu ( $p < 0.001$ ).



Şekil 5.10. *B. melitensis* ile enfekte makrofajlarda GSH-Px aktivitesi üzerine cisplatinin etkisi

### 5.11. Katalaz Aktivitesi Üzerine Cisplatinin Etkisi

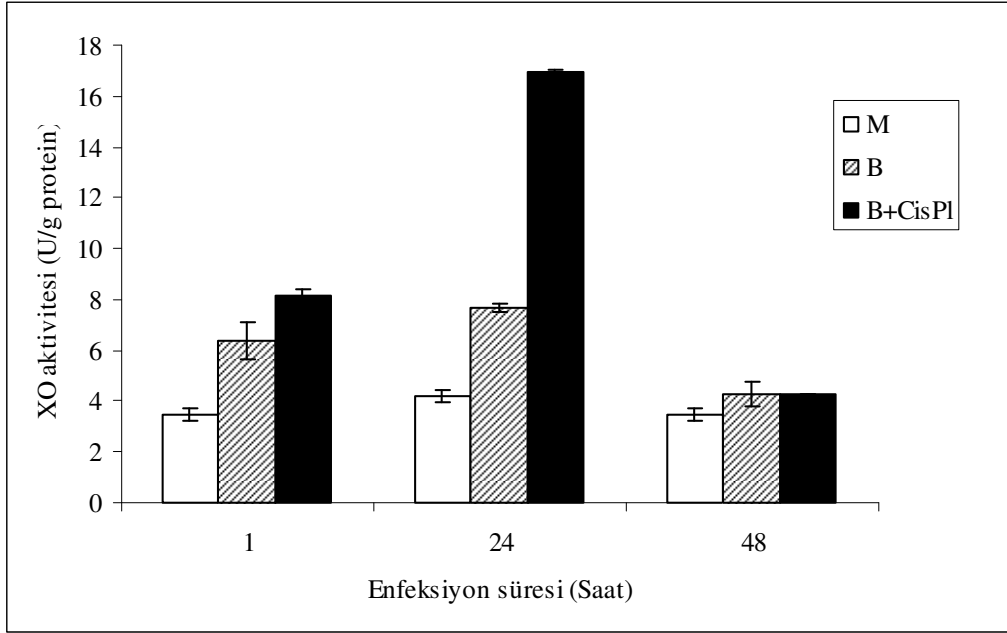
*Brucella* enfekte makrofajlar ve tedavi gruplarında cisplatin katalaz aktivitesi üzerine istatistiksel olarak bir farklılık oluşturmadı ( $p > 0.05$ ).



Şekil 5.11. *B. melitensis* ile enfekte makrofajlarda katalaz aktivitesi üzerine cisplatinin etkisi.

### 5.12. Ksantin Oksidaz (XO) Aktivitesi Üzerine Cisplatinin Etkisi

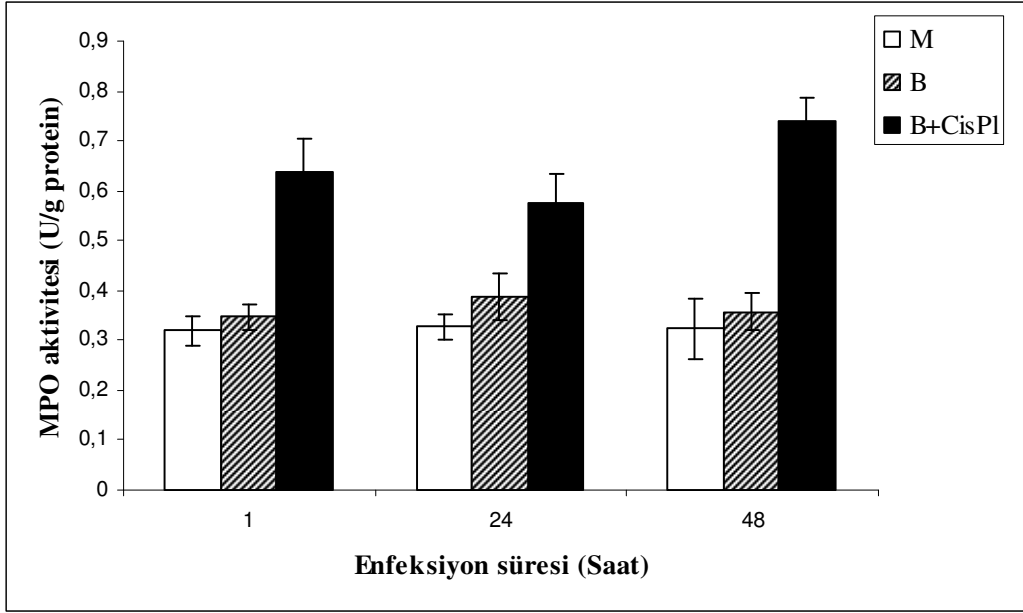
Kontrol grubu (makrofaj) ve *Brucella* enfekte makrofajlarda (cisplatin negatif) inkübasyon süreleri boyunca XO aktivitesinde önemli bir değişikliğin oluşmadığı görüldü ( $p > 0.05$ ). Tedavi gruplarında ise cisplatin uygulaması XO aktivitesini ilk 24 saatlik enfeksiyon süresince istatistiksel olarak artırdığı saptandı (B+CisPl 1. saat  $p < 0.05$ , ve 24. saat  $p < 0.001$ ).



Şekil 5.12. *Brucella* enfeksiyonunda ksantin oksidaz (XO) aktivitesi ve cisplatinin etkisi. M: enfekte edilmemiş makrofaj, B: *B. melitensis* enfekte, B+CisPl: *Brucella*+cisplatin (20  $\mu$ M).

### 5.13. Cisplatinin Myeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Üzerine Etkisi

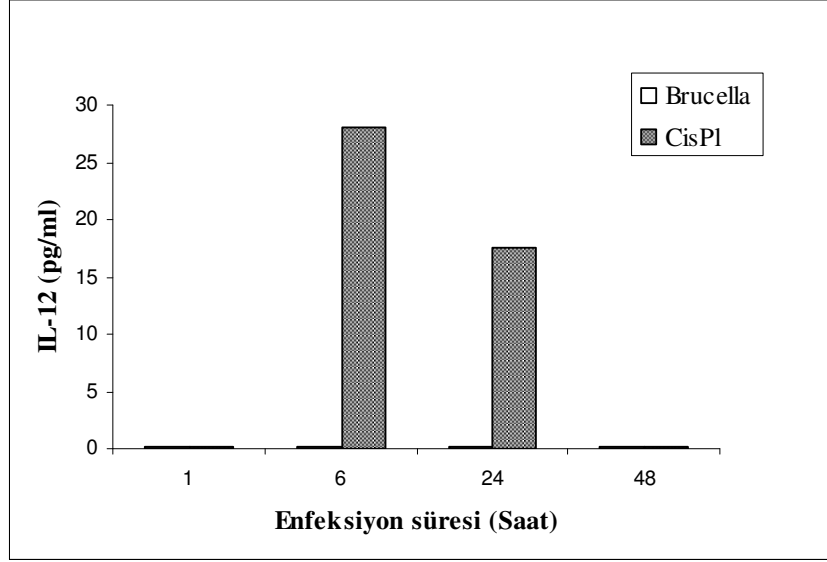
Makrofajlar ve *Brucella* enfekte makrofajlarda (cisplatin negatif) inkübasyon süreleri boyunca MPO aktivitesinde önemli bir farkın oluşmadığı saptandı ( $p > 0.05$ ). Ancak cisplatinin *Brucella* enfekte hücrelerde MPO aktivitesini 48. saatte anlamlı şekilde artırdığı belirlendi ( $p < 0.001$ ).



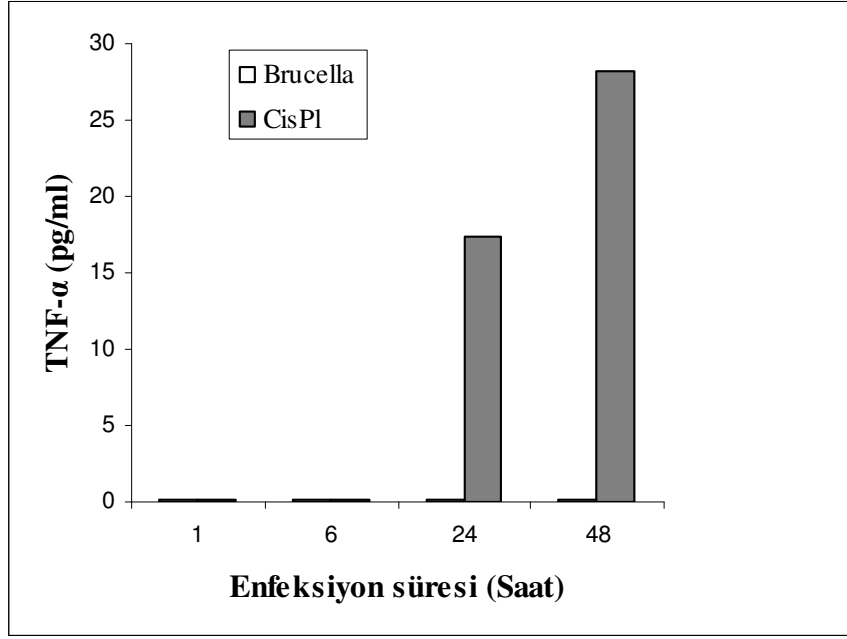
Şekil 5.13. *Brucella* enfeksiyonunda myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi. M: enfekte edilmemiş makrofaj. B: *B. melitensis*, CisPl: *Brucella*+cisplatin (20  $\mu$ M).

#### 5.14. ELISA Yöntemi ile IL-12 ve TNF- $\alpha$ Analizi

*Brucella* enfeksiyonu ve cisplatinin yangısal sitokinlerin sentezi üzerine etkileri ELISA yöntemi ile ölçüldü (IL-12 Şekil 5.14a; TNF- $\alpha$  Şekil 5.14b). *Brucella* her iki yangısal mediyatör üretimini uyarmazken, cisplatin IL-12 sentezini 6-24. saatlerde, TNF- $\alpha$ 'yı ise 24-48. saatlerde artırdı.



Şekil 5.14a. *Brucella* enfeksiyonunda IL-12 sentezi ve cisplatinin (20  $\mu$ M) etkisi ( $p < 0.001$ ).



Şekil 5.14b. *Brucella* enfeksiyonunda TNF- $\alpha$  sentezi ve cisplatinin (20  $\mu$ M) etkisi ( $p < 0.001$ ).

### 5.15. RT-PCR Yöntemi ile IL-12 ve TNF- $\alpha$ mRNA Transkripsiyon Analizi

*Brucella* ile enfekte makrofajlarda yangısal sitokinlerden IL-12 ve TNF- $\alpha$  transkripsiyonları üzerine cisplatin tedavisinin etkisi RT-PCR yöntemi ile analiz edildi. Enfeksiyon süresince her iki yangı mediyatörünün transkripsiyonu uyarılmazken, cisplatin tedavisi genlerin amplifikasyonunu farklı düzeylerde artırdı.

Tablo 2. *Brucella* enfekte makrofajlara cisplatin uygulamasının proinflamatuvar sitokinlerin mRNA transkripsiyonları üzerine etkisi

<i>Brucella</i> + CisPl		
Enfeksiyon (saat)	IL-12	TNF- $\alpha$
1	1,6	3,6
24	20,1	8,3
48	2,8	18,9

*B. melitensis* ile enfekte makrofajlara 48 saat süreyle cisplatin (20  $\mu$ M) uygulandı. *Brucella* enfekte gruptan elde edilen transkripsiyonlar 1 kabul edilip, cisplatin etkisinde buna göre kıyaslama yapıldı. Değerler misli (kat) artışı gösterir (n=3).



## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bruselloz, *Brucella* türü bakteriler tarafından insan ve hayvanlarda akut ve kronik seyirli olan zoonoz bir enfeksiyondur. Hastalık insanlarda titreme, yüksek ateş, kas ve eklem ağrıları ile seyrederek ve hastaların % 5'inden fazlasında relapslar (tekrarlama) görülebilir (Young 1995). Hayvanlarda ise yavru atma, kısırılık ve verim kayıpları gibi ekonomik problemler ile birlikte hastalığı çevreye bulaştırmaları önem taşır. Bruselloz insanlarda kombine antibiyotik kullanımı ile tedavi edilse de, hücre içi etkenler vücudun çeşitli organlarında yıllarca kalarak hastalığın tekrarlanması (% 5-10) ve kronik bir karakter kazanması olağandır.

*B. melitensis* insan brusellozunda virülansı en yüksek türdür ve ağır hastalık tablosuna neden olur (DelVecchio ve ark 2002). Eskra ve ark (2003) makrofajların *B. abortus* ile enfeksiyonunun henüz başlangıç evresinde (4. saat) bazı pro-inflamatuar sitokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) ve apoptotik gen (NF- $\kappa$ B, gibi) ekspresyonlarında uyarı (up-regulation) olduğunu rapor etmişlerdir. Fakat aynı araştırmada bazı yangı ve apoptoz uyarıcı genlerin ise baskılandığı (down-regulation) rapor edilmektedir. Yaptığımız *in vitro* bruselloz modelinde enfeksiyonu takip eden 48 saat süresince yapılan viabilite testleri ve tripan mavisi değerlendirmeleri enfekte makrofajların % 35 $\pm$ 7,5'inin ortadan kalktığını gösterdi (Şekil 5.1 ve 5.2). Bu bulgu enfekte konakta patojene karşı savunma sisteminin belirli düzeylerde uyarıldığına işaret eder. Ancak *Brucella* enfeksiyonlarında patojenin hücre içine lokalize olması, konak hücrede apoptoz ve hücre sel savunma mekanizmalarının zayıflığı enfeksiyonu yenmede yetersiz kalmaktadır (Fernandez-Prada ve ark 2003, He ve ark 2006). Antibiyotikler hücre içine çok düşük düzeylerde geçebildiklerinden intraselüler etkenlere karşı tedavide başarı şansı zorlaşmaktadır (Pappas ve ark 2005, Falagas ve Bliziotis 2006).

Bruselloz hastalığında bakteriler konak savunma sistemlerinden apoptoz, immun sistem ve oksidatif olayları yeterince uyarmaz. Bir platin türevi olan cisplatin insanlarda bazı kanser türlerinin tedavide edilmesinde uzun yıllar başarı ile kullanılmaktadır (Madasu ve ark 1997, Mansour ve ark 2002). Cisplatin farklı mekanizmalar ile apoptozu uyandır ve kanser hücrelerinin ölümüne yol açar. Bu araştırmada *Brucella* enfekte insan makrofajlarında cisplatin uygulamasının konak savunma sistemi üzerine güçlendirici etkileri *in vitro* şartlarda araştırıldı. 20  $\mu$ M konsantrasyonundaki cisplatin enfekte makrofajlarda *Brucella* grubuna göre % 80 düzeyinde hücre azalmasına neden olduğu tespit edildi (Şekil 5.1-5.3).

Cisplatin sitotoksik etkisini NO ve diğerk bazı serbest oksijen radikal üretimi ile yangı-oluşturucu sitokinlerin sentezini tetikleyerek ve DNA dublikasyonunu durdurarak apoptozu uyarmak suretiyle sağlar (Chanvorachote ve ark 2006). Apoptoz normal doku gelişimi ve hücrelerde yenilenme mekanizmalarında rol oynamakla birlikte apoptoz sırasında konak hücre ile birlikte hücre içi bakterinin de öldüğü bildirilmektedir (Wang ve ark 2001, Dornand ve ark 2002). Apoptoz aynı zamanda intraselüler bakterilerin serbest kalmasını, böylece gerek fagositik hücreler tarafından birkısmının ortadan kaldırılması, gerekse bakterilere antikor bağlanarak komplementer sistemin uyarılması ile ölümlerine neden olur (Rajashekara ve ark 2006). Cisplatin etkisi ile hücre içi *Brucella* etkenlerinin ortadan kaldırılmasında birkaç farklı mekanizma rol oynuyor olabilir. Bunlardan en önemlisi NO üretiminin uyarılmasıdır. Nitekim NO üretimi makrofaj ve *Brucella* enfekte hücrelerde sıfır seviyede iken, cisplatin uygulamasının kalıcı ve yüksek düzeylerde (> 100 µM) seyreden NO salınımına neden olduğu saptandı (Şekil 5.4). NO hücre içi süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek peroksinitritleri ve klor ile reaksiyona girerek hipokloröz asiti oluşturur. Bu moleküller bakteriler için kuvetli bakterisidal etkilidir (Akuta ve ark 2005). RT-PCR analizleri de iNOS transkripsiyonunun cisplatin tedavisi ile uyarıldığını gösterdi (Şekil 5.6). Nitekim cisplatin ile birlikte NO üretimini katalize eden iNOS inhibitörü L-NAME kullanımı cisplatinin sitotoksik etkisini tamamen ortadan kaldırdığı gözlemlendi (Şekil 5.5). Bu sonuç cisplatinin sitotoksik etkisinde NO'in önemli olduğunu göstermektedir. Daha önce NO üzerine yapılan bazı araştırmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Lopez-Urritia ve ark 2000; Watanabe ve ark 2000). İnsan brusellozunda NO üretiminin uyarılmaması enfeksiyonun kronikleşmesinde büyük önem taşımaktadır (Caron ve ark 1994, Gross ve ark 1998, Bagues ve ark 2005).

Birçok serbest radikal moleküllü hücreler için zararlı iken, NO düşük düzeylerde önemli fizyolojik işlevlerde rol alır (Lowenstein ve ark 1994). Cisplatinin aksine, NO donörü SNP kullanarak yapılan analizlerde daha düşük düzeylerde NO üretimi sağlandığı (< 50 µM); bununla birlikte SNP etkisiyle enfekte hücrelerin sayılarının azalışının aksine viabilitelerinde artışa neden olduğu daha önce yapılan bir araştırmada tespit edilmiştir (Erdogan ve ark yayınlanmamış çalışma). Bu sonuç NO'in bakteriler tarafından azot kaynağı olarak kullanılabilmesi ile açıklanabilir. Ayrıca *Brucella* etkenleri NO redüktaz aktivitesine sahip olduklarından (Wang ve ark 2001) düşük seviyelerdeki NO'in kısa sürede etkisiz hale getirilmesini sağlıyor olabilir. Nitrik oksitin bilinen birçok etkisi bulunmaktadır. Örneğin bakterilerde demir-sülfür bulunduran enzimlerde demir ile yer değiştirip metabolizmanın aksamasına neden olur. Demir enerji üretim yolları üzerinde yer

alan bazı enzimlerin yapısında kofaktör olarak bulunması sebebiyle ATP sentezinin azalması ve enerji yetmezliğine neden olur. NO, bakterilerde DNA sentezinin hız kısıtlayıcı bir enzimi olan ribonükleotid redüktazı bloke eder ve hücre DNA'sının deaminasyonu ile sitotoksik etki yapar (Taylor-Robinson 1996). Ancak cisplatin NO kullanımında eşik değer üzerinde bir üretime sebep olarak sitotoksik etki gösteriyor olabilir.

*Brucella* enfeksiyonu süresince hücre homojenta ve kültür medyumunda lipid peroksidasyon göstergesi olan aldehid türevi MDA makrofajlara göre daha düşük bulundu (Şekil 5.8). Bu etki bakterilerin CAT ve SOD aktivitesine sahip olmaları ile açıklanabilir (Kim ve ark 2000). Bakterilerin savunma mekanizması olarak gelişmiş olan bu antioksidanlar konaktan salgılanacak reaktif oksijen radikallerinin temizlenmesinde önem taşır. Cisplatinin 0.025-1.5 mg/ml arasında değişen konsantrasyonuyla yapılan kanser çalışmalarında (Hanneman ve Baumann 1991, Mansour ve ark 2002, Yıldırım ve ark 2003) böbrek dokularında lipid peroksidasyonunun arttığı saptanmıştır. Bu araştırmada da benzer sonuçlar alınmıştır. Cisplatin uygulaması makrofajlarda daha düşük olmak üzere *Brucella* enfekte hücrelere göre daha yüksek düzeyde lipid peroksidasyona neden olduğu saptandı. Apoptotik etkisi yanı sıra lipid peroksidasyonu cisplatinin yan etkilerinden biridir. Yapılan benzer deneysel çalışmalarda cisplatin tarafından oluşturulan hasarların artmış olan MDA düzeyleriyle doğrudan ilişkili olduğu belirtilmiştir (Sadzuka ve ark 1992, Silva ve ark 2001, Mora ve ark 2003).

Glutasyon (GSH), hücre içi önemli antioksidan moleküllerdendir (Skrzydewska ve Farbiszewski 1997). Bu araştırmadan elde ettiğimiz verilere göre 48 saatlik *Brucella* enfeksiyonu süresince GSH düzeyi kontrol grubu makrofajlara göre önemli bir farklılık göstermedi (Şekil 5.9). Bu sonuç hücre içi serbest radikal düzeyinin enfeksiyon ile birlikte değişmediğini veya dengede tutulduğunu göstermektedir. Ancak cisplatin tedavisi *Brucella* enfekte hücre homojenatlarında GSH düzeyini 6. ve 24. saatlerde belirgin düzeyde baskılamıştır ( $p < 0.05$ ). Ratlarda cisplatin ile yapılan çalışmalarda böbrek GSH düzeylerinde azalma gözlemlenirken (Silva ve ark 2001; Ateşşahin ve ark 2005), bazı araştırmacılar ise cisplatinin GSH düzeylerini değiştirmedeğini ve hatta arttırabileceğini bildirmektedirler (Antunes ve ark 2000, Mora ve ark 2003, Naziroğlu ve ark 2004). İntrasellüler glutasyon düzeyinin baskılanmasının, cisplatinin sitotoksik etkisinde önemli olduğunu savunan literatür bilgileri ile verilerimiz arasında paralellik bulunmaktadır (Kazuhiro ve ark 1995).

Glutasyon peroksidaz aktivitesi çeşitli hastalıklara ve fizyolojik durum değişimlerine bağlı olarak normal değerlerden sapmalar gösterebilir. Cisplatinin böbrek homojenatında GSH-Px aktivitesini anlamlı olarak azalttığı bildirilmektedir (Mansour ve ark 2002). Bu araştırmada *Brucella* enfeksiyonunun ilk saatlerinden başlayarak 48 saatlik enfeksiyon süresince kontrol grubuna göre GSH-Px aktivitesinin baskılandığı saptandı (Şekil 5.10). Bu sonuç GSH-Px'ın substratı olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülünün bakteriyel katalaz katalizörlüğünde azaltılması ile açıklanabilir. Cisplatin *Brucella* enfekte makrofajlarda GSH-Px aktivitesinde özellikle 24. saatten itibaren belirgin düzeylerde artışa neden oldu. Bu antioksidan enzim aktivitesindeki artış cisplatin etkisi ile GSH düzeyindeki azalma sonucu muhtemelen hücre içi substrat düzeyinin artışı ile açıklanabilir (Pratibha ve ark 2006). Bununla birlikte *Brucella* enfeksiyonu ve cisplatin tedavisinin katalaz aktivitesinde değişikliğe neden olmadığı saptandı (Şekil 5.11). Yapılan çalışmalar cisplatinin reaktif oksijen türlerinin üretimine, enzimatik ve non enzimatik antioksidan sistemlerin zayıflamasına neden olduğunu göstermektedir (Antunes ve ark 2001, Ateşşahin ve ark 2006). Cisplatin uygulanan ratlarda katalaz aktivitesinin baskılandığı da bildirilmektedir (Yüce ve ark 2007).

*Brucella* enfeksiyonunda serbest oksijen radikal üreten enzimlerden XO ve MPO aktivitelerinin değişmediği saptandı (Şekil 5.12-5.13). *Brucella* enfeksiyonlarında bu enzim aktiviteleri daha önce araştırılmamıştır. Cisplatin XO aktivitesini ilk 24 saatte, MPO aktivitesini ise 48 saatlik enfeksiyon süresince istatistiksel olarak artırdığı saptandı. Sırasıyla süperoksit anyonu ve hipokloröz asit sentezleyen bu iki enzim aktivitesindeki artış, enfekte hücreler üzerindeki sitotoksik etkide önem taşımaktadır. Cisplatin ile daha önce yapılan *in vivo* çalışmalarda (Güleç ve ark 2006) cisplatinin böbrekte XO ve MPO aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir. XO ve MPO aktivitelerinin cisplatin ile uyarılması sonucu artan serbest radikallere maruz kalan bakteriler üzerine sitotoksik etki yapması muhtemeldir. Çünkü, cisplatin ile birlikte antioksidan N-asetil sistein (NAC)'in enfekte makrofajlara ilavesi, hücresel ölümleri ortadan kaldırmıştır (Şekil 5.7).

*Brucella* gibi fakültatif intraselüler bakteriyel enfeksiyonlarda en önemli sorun hastalığın kronikleşmesidir. Brusellozda intraselüler yaşam ve etkenlerin hücre içinde çoğalma ve bunun altında yatan genetik mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır (Kikuchi ve ark 2006). İntraselüler enfeksiyonlara karşı direncin gelişiminde ilk olay immünolojik makrofajların uyarılmasıdır. Patojenlerin makrofajlar tarafından fagosite edilmesi veya LPS gibi yüzey molekülleri ve salgılanan toksinler konak tarafından yangısal ve yangı

önleyici sitokinlerin sentezine neden olur (Golding ve ark 2001). IL-12 ve TNF- $\alpha$  nötrofil ve makrofajlar, IFN- $\gamma$  ise T-lenfositler tarafından üretilen önemli yangısal moleküllerdir. Ancak, *B. abortus* ve *B. melitensis*'in bakteriyel toksin salgılamamaları ve yüzey LPS'lerinin zayıf antijenik özellikte olması nedeniyle konak savunma sistemini şiddetli derecede uyarmazlar (Kariminia ve ark 2002). Bu araştırmada da *B. melitensis*'in insan makrofajlarında IL-12 ve TNF- $\alpha$  üretimini uyarıcı olduğu tespit edildi (Şekil 5.14a-14b). Enfekte makrofajların cisplatin ile muamele edilmesi bu iki yangısal sitokin seviyesini çok yüksek düzeylerde olmasa da hem transkripsiyon hem de protein sentezi yönünden uyardığı saptandı (Tablo 2). IL-12 sentezi ilk 24 saat içinde geçici bir artış gösterirken, TNF- $\alpha$  üretimi ise enfeksiyonun 24. saatinde başlayıp daha uzun süreli devam etmektedir. Kemik iliği kökenli makrofajlarda yapılan araştırmada cisplatin IL-1 ve TNF- $\alpha$  ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Suresh ve Sodhi 1991). İnsan nöroblastoma hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada ise cisplatinin TNF- $\alpha$  ve iNOS mRNA transkripsiyonunu uyardığı belirtilmiştir (Ogura ve ark 1997). Elde edilen bu sonuçlara göre insanlarda bruselloz tedavisinde cisplatinin apoptotik etkisinde yangısal sitokinlerin de rolü olabileceği düşünülebilir.

Bruselloz hayvanlarda ekonomik kayıplara sebep olmakla birlikte, zoonoz bir hastalık olması hastalığın önemini daha da artırmaktadır. İnsanlarda bu hastalığa karşı etkili bir aşı henüz bulunmamaktadır. Hastalık yüksek dozlarda ve kombine antibiyotikler ile tedavi edilebilmektedir. Yetersiz tedavi ve bazı vakalarda ise tedaviye rağmen hastalık nüks edebilmektedir. Enfeksiyonun kronikleşme mekanizmaları henüz aydınlatılamamıştır. Bu sebeple alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu araştırmada geleneksel tedavi yöntemlerine alternatif olarak kemoterapötik ajanlardan cisplatin *in vitro* şartlarda çalışıldı. Cisplatinin, *B. melitensis* ile enfekte hücrelerinde IL-12 ve TNF- $\alpha$  gibi immun sistem uyarıcı ve bakterisidal etkili NO salınımını uyarak enfekte makrofajların sayısı ve viabilitelerinde önemli düzeylerde kayıplara neden olduğu saptandı. Genetik ve moleküler çalışmaların yanı sıra farklı apoptotik ajanların *in vivo* şartlarda kullanımı ile alternatif tedavi yöntemlerinin tespitinde önem taşıyabileceği sonucuna varıldı.

## 7. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Suat ERDOĞAN'a, çalışma sırasında *Brucella* etkenlerini sağlayan Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Özkan ASLANTAŞ'a, yardımlarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı doktora öğrencileri başta Vesile DÜZGÜNER olmak üzere Altuğ KÜÇÜKGÜL'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışma süresince gösterdiği manevi destek, anlayış ve yardımlarından dolayı annem Perihan HIRFANOĞLU'na, eşim Yavuz TOSYALI'ya ve biricik oğlum Lütfullah Cem TOSYALI'ya çok teşekkür ediyorum.

## 8. KAYNAKLAR

**Abu-Surrah AS, Kettunen M (2006)**, *Platinum group antitumor chemistry: design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin*. *Current medicinal chemistry*, 21, 1337-1357.

**Abbas AK, Lichtman AH, Poper JS (1994)**, *Cytokines*. *Cellular and molecular immunology*, 240-261.

**Aebi HE (1984)**, *Catalase in vitro*. *Meth enzymol*, 105, 121-126.

**Agalar C, Usubutun S, Turkyilmaz R (1999)**, *Ciprofloxacin and rifampicin versus doxycycline and rifampicin in the treatment of brucellosis*. *Eur j clin microbiol infect dis*, 18, 535-538.

**Ahren C, Jungersten L, Sandberg T (1999)**, *Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in patients with acute infectious diseases*. *Scand j infect dis*, 31, 405-407.

**Akbulut H, Çelik I, Akbulut A (2007)**, *Cytokine levels in patients with brucellosis and relations with the treatment*. *Indian journal of medical microbiology*, 25(4), 387-90.

**Akkuş I, Kalak S, Vural H, Çağlayan O, Menekşe E, Can G and Durmuş B (1996)**, *Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin c levels of patients with type II diabetes mellitus*. *Clin chim acta*, 244, 221-227.

**Akuta T, Zaki MH, Yoshitake J, Okamoto T, Akaike T (2005)**, *Nitrate stress through formation of 8-nitroguanosine: Insights into microbial pathogenesis*. *Nitric oxide*, 14, 101-108.

**Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001)**, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. *Biochem j*, 357, 593-615.

**Antunes LMG, Darin JDC, Bianchi MLP (2000)**, *Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose dependent study*. *Pharmacol res*, 41 (4), 405-11.

**Antunes LMG, Darin JDC, Bianchi MLP (2001)**, *Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats*. *Pharmacol res*, 43, 145-50.

**Armstrong D (1998)**, *Methods in Molecular Biology*. Volume 108, Toronto, Humana Press.

**Ateşşahin A, Yılmaz S, Karahan İ, Çeribası AO, Karaoğlu A (2005)**, *Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats*. *Toxicology*, 212 (2-3), 116-123.

**Ateşşahin A, Şahna E, Türk G, Çeribaşı AO, Yılmaz S, Yüce A, Bulmuş Ö (2006)**, *Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats*. J pineal res, 41, 21–7.

**Bagues MPJ, Gross A, Terraza A, Dornand J (2005)**, *Regulation of the mitogen-activated protein kinases by Brucella spp. expressing a smooth and rough phenotype: relationship to pathogen invasiveness*. Infect immun, 73, 3178-3183.

**Baykam N, Esener H, Kılıç S, Eren S (2002)**, *Brucella suflarının tiplendirilmesi ve demografik özellikler ile klinik tabloya etkisinin değerlendirilmesi*. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Program Kitabı, 293.

**Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M (1999)**, *Chemistry, physiology and pathology of free radicals*. Life sci, 65, 1865–1874.

**Bradford M (1976)**, *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal biochem, 72, 248–254.

**Caron E, Peyrard TU, Köhler S, Cabane S, Liautard JP and Dornand J (1994)**, *Live Brucella spp. fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes*. Inf and immunity, 62, 5267-5274.

**Carr AC, McCall MR, Frei B (2000)**, *Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species reaction pathways and antioxidant protection*. Arterioscl thromb vasc biol, 20, 1716–1723.

**Chanvorachote P, Nimmannit U, Stehlik C, Wang L, Jiang BH, Ongpipatanakul B and Rojanasakul Y (2006)**, *Nitric Oxide regulates cell sensitivity to cisplatin-induced apoptosis through s-nitrosylation and inhibition of Bcl-2 ubiquitination*. Cancer research, 66, 6353-6360.

**Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C (2005)**, *Potential markers of oxidative stress in stroke*. Free radical biology & medicine, 39, 841–852.

**Chiueh CC (1999)**, *Neuroprotective properties of nitric oxide*. Ann ny acad sci, 890, 301–311.

**Christenson JC (2002)**, *Brucellosis*. In: Jenson HB, Baltimore RS (eds). Pediatric Infectious Diseases, (2 nd edition), Philadelphia: WB Saunders Companys, 379-82.

**Christopher GW, Agan BK, Cieslak TJ, Olson PE (2005)**, *History of U. S. military contributions to the study of bacterial zoonoses*. Military medicine, 170, 39–48.

**Chugh TD, Nusrat H, Mustafa AS (2001)**, *A study of secreted cytokine profile in human brucellosis*. 11<sup>th</sup> Eccmid, İstanbul, 601.

**Corbel MJ (1997)**, *Brucellosis: an overview*. Emerg infect dis, 3, 213-221.



**Corbel MJ, MacMillan AP (1998)**, *Brucellosis*. “Collier L, Balows A, and Sussman M (eds.): Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Georgina Bentliff, U.K, 819.

**Cortas NK, Wakid NW (1990)**, *Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method*. Clinical chemistry, 36, 440-443.

**DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G and Mujer C (2002)**, *The genome sequence of the facultative intracellular pathogen Brucella melitensis*. Proc. natl. acad. sci, 99, 443-448.

**Desideri A, Falconi M (2003)**, *Prokaryotic Cu, Zn superoxidies dismutases*. Biochem soc trans, 31, 1322-1325.

**Doganay M, Aygen B (2003)**, *Human brucellosis: an overview*. Int j infec dis, 7, 173-182.

**Doner F, Delibas N, Dogru H, Sarı I, Yorgancigil B (1999)**, *Malondialdehyde levels and superoxide dismutase activity in experimental maxillary sinusitis*. Auris Nasus Larynx, 26, 287-291.

**Dornand J, Gross A, Lafont V, Liautard J, Oliaro J, Liautard JP (2002)**, *The innate immune response against Brucella in humans*. Vet microbiol, 90, 383-394.

**Eskra L, Mathison A, Splitter G (2003)**, *Microarray analysis of mRNA levels from RAW264.7 macrophages infected with Brucella abortus*. Infect. immun, 71, 1125-1133.

**Erdogan S, Çelik S, Aslantaş Ö, Konaş T, Ocak S (2006)**, *Elevated cAMP levels reverse Brucella melitensis-induced lipid peroxidation and stimulate IL-10 transcription in rats*. Res vet sci, 82(2), 181-186.

**Erdogan S, Aslantaş Ö, Çelik S, Atik E (2008)**, *The effects of increased cAMP content on inflammation, oxidative stress and PDE4 transcripts during Brucella melitensis infection*. Research in veterinary science, 84, 18-25.

**Falagas ME, Bliziotis IA (2006)**, *Quinolones for treatment of human brucellosis: critical review of the evidence from microbiological and clinical studies*. Antimicrob. agents chemother, 50, 22-33.

**Fernandez-Prada CM, EB Zelazowska, M Nikolich, TL Hadfield, RM Roop, Robertson GL and Hoover DL (2003)**, *Interactions between Brucella melitensis and human phagocytes: bacterial surface Opolysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis*. Infect. immun, 71, 2110-2119.

**Ficht TA (2003)**, *Intracellular survival of Brucella: defining the link with persistence*. Vet microb, 92, 213-223.

**Fugier E, Pappas G, Gorvel JP (2007),** *Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment.* Expert reviews in molecular medicine, 9(35), 1-10.

**Fuing RD, Groshek MA (2000),** *Brucellosis.* In: Behrman RE, Kliegman RM (eds). Nelson Textbook of Pediatrics. (16th edition), Philadelphia, WB Saunders Company, 867-9.

**Gee JM, Kovach ME, Grippe VK, Hagijs S, Walker JW, Elzer PH and Roop RM (2004),** *Role of catalase in the virulence of Brucella melitensis in pregnant goats.* Veterinary microbiology, 102, 111–115.

**Ghafourifar P, Cadenas E (2005),** *Mitochondrial nitric oxide synthase.* Trends pharmacol sci, 26, 190–195.

**Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N and Golding H (2001),** *Immunity and protection against Brucella abortus.* Microbes infect, 3, 43–48.

**Gotuzzo E, Cellillo C (1992),** *Brucella.* In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds). Infectious Diseases 2<sup>nd</sup> Edition, W.B. Saunders Co, Philadelphia, 1513-21.

**Gorvel JP, Moreno E (2002),** *Brucella intracellular life: from invasion intracellular replication.* Vet. microbiol, 90, 281–297.

**Grisham MB (1997),** *Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine.* Biochem. biophys. res. commun, 169, 70-5.

**Gross A, Spiesser S, Terraza A, Rouot B, Caron E and Dornand J (1998),** *Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in Brucella suis-infected murine macrophages.* Infect immun, 66, 1309-1316.

**Gross A, Terraza A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP, Dornand J (2000),** *In vitro Brucella suis infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells.* Infect immun, 68, 342–351.

**Gross A, Bouaboula M, Casellas P, Liautard JP, Dornand J (2003),** *Subversion and utilization of the host cell cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A pathway by Brucella during macrophage infection.* J immunol, 170, 5607-5614.

**Gross A, Bertholet S, Mauel J, Dornand J (2004),** *Impairment of Brucella growth in human macrophagic cells that produce nitric oxide.* Microbial pathogenesis, 36, 75-82.

**Güleç M, Iraz M, Yılmaz HR, Özyurt H, Temel I (2006),** *The effects of ginkgo biloba extract on tissue adenosine deaminase, xanthine oxidase, myeloperoxidase, malondialdehyde, and nitric oxide in cisplatin-induced nephrotoxicity.* Toxicol ind health, 22(3), 125-30.

- Halliwell B (1991)**, *Drug antioxidant effects*. *Drugs*, 42(4), 569-605.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998)**, *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing*. *Blood*, 92(9), 3007-17.
- Hanneman J, Baumann K (1991)**, *Nephrotoxicity of cisplatin, carboplatin and transplatin. A comparative in vitro study*. *Arch toxico*, 64, 393-400.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE (1992)**, *Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? The journal of laboratory and clinical medicine*, 119(6), 598-620.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2001)**, *Free radicals and other reactive species in disease*. *Free radicals in biology and medicine*, 22-24.
- Halliwell B, Whiteman M (2004)**, *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* *Br j pharmacol*, 142, 231-255.
- He Y, Reichow S, Ramamoorthy S, Ding X, Lathigra R, Craig JC, Sobral BWS, Schurig GG, Sriranganathan N and Boyle SM (2006)**, *Brucella melitensis triggers time-dependent modulation of apoptosis and down-regulation of mitochondrion-associated gene expression in mouse macrophages*. *Infection and immunity*, 74 (9), 5035-5046.
- Ikeguchi M, Liu J, Kaibara N (2002)**, *Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment*. *Apoptosis*, 7(1), 23-29.
- Jamieson ER, Lippard SJ (1999)**, *Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts*. *Chem rew*, 99, 2467-2498.
- Kariminia A, Kavossy G, Khatami S, Zowghi E, Ardestani SK (2002)**, *Study of interleukin-10 and interleukin-12 productions in response to lipopolysaccharides extracted from two different Brucella strains*. *Comp immunol microbiol infect dis.*, 25(2), 85-93.
- Kazuhiro GY, Morikawa T, Urata Y, Suzuki K, Kondo Y (1995)**, *Augmentation of transport for cisplatin-glutathione adducts in cisplatin-resistant cancer-cells*. *Cancer res*, 55, 4297-4301.
- Kikuchi H, Kim S, Watanabe K, Watarai M (2006)**, *Brucella abortus D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase contributes to its intracellular replication and resistance against nitric oxide*. *FEMS microbiol lett*, 259, 120-125.
- Kim JA, Sha Z, Mayfield JE (2000)**, *Regulation of Brucella abortus catalase*. *Infection and Immunity*, 3681-3866.
- Klebanoff SJ (1999)**, *Myeloperoxidase*. *Proc assoc am physicians.*, 111(5), 383-389.

**Ko J, Splitter GA (2003)**, *Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans*. Clin microbiol rev, 65-78.

**Kruidering M, Water BV, Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF (1997)**, *Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain*. J pharmacol exp ther, 280, 638–649.

**Kuhlman MK, Burkhardt G, Kohler H (1997)**, *Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application*. Nephrol dial transplant, 12, 2478-80.

**Kuhlmann MK, Horsch E, Burkhardt G, Wagner M, Köhler H (1998)**, *Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin*. Arch toxicol, 72, 536-540.

**Landis GN, Tower J (2005)**, *Superoxide dismutase evolution and life span regulation*. Ech ageing dev, 126, 365–379.

**Lee KB, Wang D, Lippard SJ, Sharp PA (2002)**, *Transcription-coupled and DNA damage-dependent ubiquitination of RNA polymerase II in vitro*. Proc natl acad sci, 99, 4239-4244.

**Leibbrandt MEI, Grushenka HIW, Metz AL, Oziba AA, Haskins JR (1995)**, *Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat proximal tubule cells*. Kidney int, 48, 761-770.

**Lin JY, Chadee K (1992)**, *Macrophage cytotoxicity against Entamoeba histolytica trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine*. J immunol, 148, 3999-4005.

**Lopez-Urritia L, Alonso A, Nieto ML, Bayon Y, Orduna A and Crespo MS (2000)**, *Lipopolysaccharides of Brucella abortus and Brucella melitensis induce nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages*. Infect immun, 68, 1740-5.

**Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH (1994)**, *Nitric oxide: A physiologic Messenger*. Ann intern med, 120, 227-37.

**MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997)**, *Nitric oxide and macrophage function*. Annu. rev. immunol, 15, 323–350.

**Madasu R, Ruckenstein MJ, Leake F, Steere E, Robbins T (1997)**, *Ototoxic effects of supradose cisplatin with sodium thiosulfate neutralization in patients with head and neck cancer*. Arch otolaryngol head neck surg, 123, 978-981.

**Mansour MA, Mostafa AM, Nagi MN, Khattab MM, Al-Shabanah OA (2002)**, *Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats*. Comp biochem physiol c, 132, 123-128.

**Marnett LJ (2002)**, *Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage*. Toxicology, 181(2), 219-22.

**Mates JM, Perez-Gomez C, De INC (1999)**, *Antioxidant enzymes and human diseases*. Clin biochem, 32, 595–603.

**McCall MR, Frei B (1999)**, *Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?* Free rad biol meds, 26, 1034–1105.

**McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahbaubi A, Shi Y (1995)**, *The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro*. Methods cell biol., 46, 153-85.

**McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF (1999)**, *Endothelial function in hypertension: The role of superoxide anion*. Hypertension, 34, 539-545.

**Melek IM, Erdogan S, Celik S, Aslantas O, Duman T (2006)**, *Evaluation of oxidative stress and inflammation in long term Brucella melitensis infection*. Mol cell biochem, 293, 203-209.

**Mishima K, Baba A, Matsuo M, Itoh Y, Oishi R (2006)**, *Protective effect of cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity*. Free radical biology & medicine, 40, 1564–1577.

**Mora LO, Antunes LM, Francescato HD, Bianchi ML (2003)**, *The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats*. Pharmacol res, 47, 517-522.

**Moreno E, Moriyon I (2002)**, *Brucella melitensis: a nasty bug with hidden credentials for virulence*. Proc. natl. acad. sci, 99, 1–3.

**Nazıroğlu M, Karaoğlu A, Aksoy AO (2004)**, *Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats*. Toxicology, 195 (2-3), 221-230.

**Nyska A, Kohen R (2002)**, *Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. Toxicol pathol, 30, 620–650.

**Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N (2005)**, *Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects*. Biochemical and biophysical research communications, 338, 668–676.

**Nororiha IL, Niemir Z, Stein H, Waldher R (1995)**, *Cytokines and growth factors in renal disease*. Nephrol dial transplant, 10, 775-786.

**Ogura T, Tatemichi M, Esumi H (1997)**, *TNF-alpha mediates inducible nitric oxide synthase expression in human neuroblastoma cell line by cisplatin*. Biochemical and biophysical research communications, 233(3), 788-791(4).

**Orozco G, Lopez-Nevot MAS, Caballero A, Bravo MJ, Morata P, Colmenero JD, Alanso A and Martin J (2003)**, *Inducible nitric oxide synthase promoter polymorphism *sn* human brucellosis*. *Microbes and infection*, 5, 1165-1169.

**Paglia DE, Valentine WN (1967)**, *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase*. *J lab clin med*, 70, 158.

**Pappas, G, Akritidis N, Tsianos E (2005)**, *Effective treatments in the management of brucellosis*. *Expert opin. pharmacother*, 6, 201–209.

**Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N (2006)**, *Brucella as a biological weapon*. *Cell. mol. life sci*, 63(19-20), 2229-36.

**Parke DV (1999)**, *Nutritional antioxidants and disease prevention; mechanism of action*. *Antioxidants in human health and disease*, 215-226.

**Parks RR, Huang CC, Haddad JJ (1994)**, *Evidence of oxygen radical injury in experimental otitis media*. *Laryngoscope*, 104, 1389–1392.

**Powell SR (2000)**, *The Antioxidant Properties of Zinc*. *Journal of nutrition*, 130, 1447-1454.

**Prajda N, Weber G (1975)**, *Malignant transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas*. *FEBS lett*, 59, 245-249.

**Pratibha R, Sameer R, Rataboli PV, Bhiwgade DA, Dhume CY (2006)**, *Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats*. *European journal of pharmacology*, 532, 290-293.

**Pratic`o D (2005)**, *Antioxidants and endothelium protection*. *Atherosclerosis*, 181, 215–224.

**Rajashekara G, Eskra L, Mathison A, Petersen E, Yu Q, Harms J and Splitter G (2006)**, *Brucella: functional genomics and host-pathogen interactions*. *Animal health research reviews* 7(1/2), 1-11.

**Ramesh G, Reeves WB (2002)**, *TNF- $\alpha$  mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity*. *J clin invest*, 110(6), 835-42.

**Raptopoulou-Gigi M, Boura P, Valcanos N, Goulis G (1983)**, *Conventional therapy and levamisole in the management of chronic brucellosis*. *J infect diss*. 147, 1123.

**Reddy R ve Yao JK (1999)**, *Schizophrenia-role of oxidative stress and essential fatty acids*. **Kitap:** Basu TK, Temple NJ, Garg ML, *Antioxidants in human health and disease*. UK, CABI Publishing

**Rosenberg B (1999)**, *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes*

on. In: Lippert B, ed. Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. Switzerland: Wiley-VCH, Basel, 3-27.

**Sadzuka Y, Shoji T, Takino Y (1992)**, *Mechanism of the increase in lipid peroxide induced by cisplatin in the kidneys of rats*. Toxicol lett, 62(2-3), 293-300.

**Salahudeen A, Badr K, Morrow J, Roberts II J (1996)**, *Hydrogen peroxide induced 21-aminosteroid-inhibitable F2-isoprostane production and cytolysis in renal tubular epithelial cells*. J am soc nephrol, 1300-5.

**Santovito G, Irato P, Piccinni E, Albergoni V (2000)**, *Relationship between metallothionein and metal contents in red-blooded and white-blooded antarctic teleosts*. Polar biol, 23, 383-391.

**Satyanarayan GB, Snigdha M, Yun M, Nie Z, Whitworth CA et all (2002)**, *Cisplatin upregulates the adenosine A1 receptor in the rat kidney*. Euro j pharmacol, 442, 251-64.

**Schonelch C (1999)**, *Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach*. Exp gerontol jan, 34, 19.

**Sedlak J, Lindsay RH (1968)**, *Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent*. Anal Biochem, 25, 192-205.

**Sentürker S, Tschirret-Guth R, Morrow J, Levine R, Shacter E (2002)**, *Induction of apoptosis by chemotherapeutic drugs without generation of reactive oxygen species*. Archives of biochemistry and biophysics, 397(2), 262-272.

**Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griending KK 2002**, *Angiotension II stimulation of NADPH oxidase activity: upstream mediators*. Circulation research, 91, 406-413.

**Shamelian SOA (2000)**, *Diagnosis and treatment of brucellosis*. Neth j meds, 56, 198-9.

**Shepherd MC, Baillie GS, Stirling DI, Houslay MD (2004)**, *Remodelling of the PDE4 cAMP phosphodiesterase isoform profile upon monocyte-macrophage differentiation of human U937 cells*. British journal of pharmacology, 142, 339-351.

**Silva CR, Antunes LMG, Bianchi ML (2001)**, *Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats*. Pharmacol res, 43(6), 561-566.

**Singh RAK, Sodhi A (1999)**, *Expression and activation of RAS and mitogen-activated protein kinases in macrophages treated in vitro with cisplatin: Regulation by kinases, phosphatases and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin*. Immunology and cell biology, 77, 356-363.

**Skrzydłewska E, Farbiszewski R (1997)**, *Decreased antioxidant defense mechanisms in rat liver after methanol intoxication*. Free radic res, 27, 369-375.

**Solera J, Martinez-Alfaro E, Espinosa A (1997)**, *Recognition and optimum treatment of brucellosis*. *Drugs*, 53, 245.

**Srivastava RC, Farookh A, Ahmad N, Misra M, Hasan SK, Husain MM (1999)**, *Evidence for the involvement of nitric oxide in cisplatin-induced toxicity in rats*. *Biometals*, 9(2), 139-42.

**Sugiyama S, Hayakawa M, Kato T, Hanaki Y, Shimuza K et al (1989)**, *Adverse effect of anti-tumor drug, cisplatin, on rat kidney mitochondria: Disturbances in glutathione peroxidase activity*. *Biochem biophys res commun*, 159, 1121-7.

**Suresh A, Sodhi A (1991)**, *Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by bone marrow-derived macrophages: effect of cisplatin and lipopolysaccharide*. *Immunol lett.*, 30(1): 93-100.

**Suzuki K, Ota H, Sasapawa S, Sakatani T, Fujikura T (1983)**, *Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes*. *Analytical biochemistry*, 132(2), 345-52.

**Taylor-Robinson AW, Severn A, Phillips RS (1996)**, *Kinetics of nitric oxide production during infection and reinfection of mice with Plasmodium chabaudi*. *Parasite-immunology*, 18(8), 425-30.

**Teixeira-Gomes AP, Cloeckert A, Zygmunt MS (2000)**, *Characterization of heat, oxidative, and acid stress response in Brucella melitensis*. *Infect immun*, 68, 2954.

**Thannickal VJ, Fanburg BL (2000)**, *Reactive oxygen species in cell signaling*. *American journal of physiology: lung cell molecular physiology*, 279, 1005- 1028.

**Türütoğlu H, Mutluer B, Uysal Y (2003)**, *Burdur yöresinde toplanan sütlerin Brucella enfeksiyonu yönünden araştırılması*. *Türk j vet anim sci*, 27, 1003-1009.

**Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004)**, *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence*. *Mol cell biochem*, 266, 37-56.

**Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL (2004)**, *Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy*. *Endocrine reviews*, 25, 612-628.

**Wang M, Qureshi N, Soeurt N, Splitter G (2001)**, *High levels of nitric oxide production decrease early but increase late survival of Brucella abortus in macrophages*. *Microb pathog* 31, 221-230.

**Wang D, Lippard SJ (2005)**, *Cellular processing of platinum anticancer drugs*. *Nat rev drug discov*, 4, 307-320.

**Watanabe KI, Hess A, Bloch W, Michel O (2000)**, *Nitric oxide synthase inhibitor suppresses the ototoxic side effect of cisplatin in guinea pigs*. *Anticancer drugs*, 11, 401-6.



**WHO (2004)**, *Brucellosis in humans and animals: WHO guidance*. Geneva: Department of communicable disease surveillance and response, World health organization.

**Woods JR, Plessinger MA, Miller RK (2001)**, *Vitamins C and E: missing links in preventing premature rupture of membranes*. American journal of obstetrics and gynecology, 185, 5-10.

**Yıldırım Z, Söğüt S, Odacı E, Iraz M, Özyurt H, Koltuk M and Akyol Ö (2003)**, *Oral erdoesteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats*. Pharmacol res, 47, 149-156.

**Yingst S, Hoover DL (2003)**, *T cell immunity to brucellosis*. Crit rev microbiol, 29,313.

**Yoshoiko T, Kawada K, Shimada T (1979)**, *Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood*. Am j obstet gynecol, 135, 372–376.

**Young EJ (1995)**, *An overview of human brucellosis*. Clin infect diss, 21, 283–289.

**Young IS, Woodside JV (2001)**, *Antioxidants in health and disease*. J clin pathol, 54, 176-186.

**Yüce A, Ateşşahin A, Çeribaşı AO, Aksakal M (2007)**, *Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats*. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 101, 345–349.

**Zicca A, Cafaggi S, Mariggio MA, Vannozzi MO, Ottone M, Bocchini V, Caviglioli G and Viale M (2002)**, *Reduction of cisplatin hepatotoxicity by procainamide hydrochloride in rats*. European journal of pharmacology, 442(3), 265-272.

## **9. ÖZGEÇMİŞ**

1979 yılında İskenderun/HATAY'da doğdu. 1996 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2001 yılında mezun oldu. Lisans eğitimi süresince kendi bölümü tarafından yürütülen çalışmalarda görev aldı. 2005 yılında MKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı.