



Akut Brusellozda NETozis Belirteçleri

Markers of NETosis in Acute Brucellosis

Gamze BİNER¹(iD), Hande CANPINAR²(iD), Ahmet Çağkan İNKAYA³(iD)

¹ Ankara Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara, Türkiye

² Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

³ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Makale atfı: Biner G, Canpinar H, İnkaya AÇ. Akut brusellozda NETozis belirteçleri. FLORA 2025;30(2):156-164.

ÖZ

Giriş: NETozis, nötrofiller için bir hücre ölümü şekli olup, nötrofillerin hücre dışı kromatin, proteinler ve granüllerle tuzaklanmasını içeren bir savunma sistemidir. Peptidil arjinin deiminaz 4 (PAD4), nötrofil elastaz (NE) ve nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL), NETozis ile ilişkili biyobelirteçlerdir. Bu çalışmada, bruselloz hastalığı sürecinde NETozis belirteçlerinin zamansal değişimlerinin tanımlanması ve bu değişimlerin hastalığın klinik seyriyle ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışma, akut bruselloz tanısı koyulan 36 hasta ve 20 sağlıklı kontrol ile gerçekleştirilmiştir. Klinik bulgular ve kan değerleri tanı anında (0. gün) ve tedavi sonundaki 45. günde kaydedilmiştir. Nötrofil elastaz, PAD4 ve NGAL NETozis belirteçlerinin ELISA yöntemiyle incelenmesi amacıyla tüm hastalardan tanı sırasında (0. gün) ve tedavi sonrası 45. günde kan örnekleri alınmıştır (tedavi sonrası 45. gün verisi 19 hasta için sağlanmıştır).

Bulgular: Tanı anında (0. gün) hasta grubunun PAD4 ve NGAL seviyeleri, sağlıklı kontrol grubundan ve tedavi sonrası 45. günde kaydedilenlerden daha yüksek bulunmuştur ancak NE düzeyinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Sonuç: Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin ve PAD4, brusellozda NETozis belirteçleridir ve literatürde daha önce gösterilmemiş öncü bir çalışma olarak, NGAL ve PAD4'ün bruselloz tedavi yanıtını değerlendirmede kullanılabilecek biyobelirteçler olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Bruselloz; NETozis; Biyobelirteç; PAD4; NGAL

ABSTRACT

Markers of NETosis in Acute Brucellosis

Gamze BİNER¹, Hande CANPINAR², Ahmet Çağkan İNKAYA³

¹ Clinic of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Abdurrahman Yurtaslan Oncology Hospital, Ankara, Türkiye

² Department of Basic Oncology, Hacettepe University Cancer Institute, Ankara, Türkiye

³ Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Türkiye

Introduction: NETosis is a form of cell death for neutrophils, involving an extracellular trapping mechanism that utilizes chromatin, proteins, and granules as a defense system. Neutrophil elastase (NE), peptidylarginine deiminase 4 (PAD4), and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) are biomarkers associated with NETosis. This study aims to describe the temporal changes in NETosis markers during the course of brucellosis and to correlate these changes with the clinical progression of the disease.

Geliş Tarihi/Received: 20/11/2024 - Kabul Ediliş Tarihi/Accepted: 10/04/2025



Materials and Methods: The study was conducted with 36 patients diagnosed with acute brucellosis and 20 healthy controls. Clinical findings and blood parameters were recorded at the time of diagnosis (day 0) and on day 45, post-treatment. Blood samples were collected from all patients at diagnosis (day 0) and on day 45 after treatment to analyze NETosis markers NE, PAD4, and NGAL using the ELISA method. Day 45 data were available for 19 patients.

Results: At the time of diagnosis (day 0), PAD4 and NGAL levels in the patient group were higher than those in the healthy control group and the levels measured on Day 45 post-treatment; however, no significant difference was observed in NE levels.

Conclusion: NGAL and PAD4 are markers of NETosis in brucellosis, and as a pioneering study not previously reported in the literature, our findings suggest that NGAL and PAD4 may serve as potential biomarkers for evaluating treatment response in brucellosis.

Key Words: Brucellosis; NETosis; Biomarker; PAD4; NGAL

GİRİŞ

Bruselloz, *Brucella* spp. bakterilerinin neden olduğu zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır ve hem insanları hem de hayvanları etkileyerek küresel bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir^[1]. Hastalık, enfekte hayvanlarla doğrudan temas veya kontamine hayvansal ürünlerin tüketimi yoluyla bulaşarak endemik bölgelerdeki bireyler ve seyahat edenler için risk oluşturmaktadır^[2]. Bruselloz, ateş, halsizlik, yorgunluk ve çeşitli organ tutulumu gibi geniş bir klinik yelpazede ortaya çıkabilen febril bir hastalık olarak görülmektedir. Tanı ve tedavideki ilerlemelere rağmen brusellozun seyri ve sonuçlarını öngörmek hala zordur. Prognostik değerlendirmesini iyileştirme konusunda umut vadeden bir araştırma alanı, biyobelirteçlerin tanımlanmasıdır. Biyobelirteçler, biyolojik örneklerde ölçülebilir göstergeler olup hastalığın varlığı, ilerlemesi veya tedaviye yanıtı hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır^[3]. Bruselloz bağlamında, çeşitli biyobelirteçler potansiyel prognostik kriterleri olarak araştırılmış, hastalığın izlenmesi ve tedavi değerlendirmesinde kullanılabilir hale gelmiştir^[4]. Ancak mevcut biyobelirteç yelpazesi sınırlıdır ve klinik karar verme sürecini yönlendirecek daha doğru öngörücülere ihtiyaç vardır. Nötrofiller, bağışıklık sisteminin ilk savunma hattını oluşturan en bol beyaz kan hücresi türüdür ve patojenlere karşı doğuştan gelen bağışıklık yanıtında önemli bir rol oynar^[5]. Bu hücreler, enfeksiyon ajanlarını ortadan kaldırmak için çeşitli mekanizmalar kullanır^[6]. Bu mekanizmalardan biri, kromatin, proteinler ve granüllerden oluşan hücre dışı tuzakların salınmasını içeren benzersiz bir nötrofil ölümü şekli olan NETozis'tir. Nötrofil hücre dışı tuzakları (NET'ler) olarak bilinen bu yapılar, patojenleri yakalayıp etkisiz hale getirerek bağışıklık yanıtına katkıda bulunurlar^[7,8]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, NETozis ve enfeksiyöz hastalıkların patogenezi arasındaki olası ilişkiyi incelemiştir^[9].

Araştırmacılar tarafından, peptidil arjinin deiminaz 4 (PAD4), nötrofil elastaz (NE), nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL), proteinaz-3 ve "hücre-siz" nükleozomlar gibi NETozis ile ilişkili spesifik biyobelirteçler keşfedilmiştir^[10]. Bu biyobelirteçlerin NETozis göstergeleri olarak potansiyel taşıdıkları ve hastalık şiddetini artırmada rol oynadıkları gözlemlenmiştir^[11]. Akut bruselloz tanısı almış hastalardaki PAD4 ve NGAL seviyeleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırılarak, bu belirteçlerin hastalığın ilerlemesi ve tedavi yanıtı için değerli göstergeler olup olamayacağı belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmanın bulguları, brusellozun patogenezi hakkında yeni bilgiler sunma ve prognostik değerlendirmeye yönelik yenilikçi bir yaklaşım sağlama potansiyeline sahiptir. NETozis ve ilişkili belirteçlerin rolünü anlamak, daha etkili tanı araçlarının geliştirilmesine, kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin oluşturulmasına ve bruselloz hastalarında daha iyi klinik sonuçların elde edilmesine katkıda bulunabilir. NETozis ve hastalığın seyri arasındaki karmaşık ilişkinin çözülmesi, literatürü bu zorlu enfeksiyon hastalığının daha iyi yönetilmesine bir adım daha yaklaştırması mümkündür.

MATERYAL ve METOD

Çalışma Tasarımı

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel İmmünoloji Anabilim Dalında yürütülmüştür. Çalışma, Temmuz 2021 ile Ocak 2023 arasında, Ardahan Devlet Hastanesi ve Hacettepe Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniklerine başvuran ve akut bruselloz tanısı almış 36 hasta ile 20 sağlıklı gönüllü üzerinde gerçekleştirilmiştir. İnsan katılımcıların dahil olduğu çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve onaylanmıştır (protokol kodu 2021/13, 29/06/2021). Hastalar ve sağlıklı gönüllüler, çalışmaya katılmak için yazılı bilgilendirilmiş onam vermiştir.

Akut bruselloz tanısı

- Ateş, gece terlemesi, eklem ağrısı, kas ağrısı, sırt ağrısı, kilo kaybı, iştahsızlık, yorgunluk ve baş ağrısı gibi semptomların varlığı (ateş= tek ölçümde 38.3 °C veya vücut sıcaklığı iki ölçüm arasında bir saat aralıkla 38-38.3 °C arası; artrit: en az iki eklemde ağrı, şişlik, kızarıklık veya hassasiyet bulunması),
- Brucella aglütinasyon test sonucunun 1/160 veya daha yüksek olması veya kan kültüründe *Brucella* spp. izole edilmesi,
- Daha önce bruselloz tedavisi geçmişi olmaması.

Tüm hastaların klinik semptomları (bir veri toplama formu kullanılarak kaydedildi) ve laboratuvar parametreleri (tam kan sayımı ve biyokimya) ilk ziyaret (0. gün) ve tedavi sonu (45. gün) olarak belgelendi. Ayrıca, NE, PAD4 ve NGAL seviyelerini ölçmek için tanı sırasında (0. gün) tüm hastalardan ve tedavi sonrası 45. günde 19 hastadan kan örnekleri alındı. Sırt, boyun veya kalça ağrısı şikayetleri olan hastalar, spondilodiskit tanısı için kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yapılarak çalışmadan çıkarıldı.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri; daha önce bruselloz tedavisi görmemiş olma; 18-90 yaş aralığında, her iki cinsiyetten olma; gebe olmama; son 12 hafta içinde ateş, yorgunluk, iştahsızlık, gece terlemeleri veya istemsiz kilo kaybı gibi semptomları yaşamış olma olarak belirlendi. Çalışmadan dışlanma kriterleri ise 18 yaş altı veya 90 yaş üstünde olma; daha önce bruselloz tedavisi almış olma, çalışmaya katılmayı reddetmiş olma ve bruselloz spondilodiskit tanısı alma (uzun süreli tedavi gereksinimi nedeniyle hariç tutulmuştur) olarak belirlenmiştir.

Bruselloz öyküsü olmayan, klinik semptom göstermeyen, 18-90 yaş aralığında, otoimmün veya otoinflamatuar hastalık öyküsü bulunmayan ve aktif veya geçmiş kanser öyküsü olmayan sağlıklı gönüllüler kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Örneklerin Toplanması

Periferik kan örnekleri hem kontrol grubu hem de hasta grubundan toplandı. Kan örnekleri, 5 ml sarı kapaklı tüplere alınıp 2000 rpm hızında 10 dakika santrifüj edilerek serum örnek-

leri elde edildi. Ayrılan serum örnekleri ELISA analizine kadar -20 °C'de saklandı.

NETozis Biyobelirteçlerinin Analizi

Nötrofil elastaz, PAD4 ve NGAL, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak enzim bağlantılı immunosorbent analiz (ELISA) kitleri (Nepenthe®-lot no: 3022, Türkiye) ile serum örneklerinde değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Shapiro-Wilk testiyle test edilmiştir. Normal dağılıma uyan değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma ile verilmiş olup, iki bağımsız grup arasında karşılaştırmalarda bağımsız örneklem t-testi, iki bağımlı grubun karşılaştırılmasında ise eşleştirilmiş örneklem t-testi kullanılmıştır. Normal dağılıma uymayan değişkenler medyan (minimum-maksimum) değerler ile verilmiş olup, iki bağımsız grup arasında karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi, iki bağımlı grubun karşılaştırılmasında ise Wilcoxon testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenler frekans ve yüzde değerleri [n (%)] ile verilmiş olup, karşılaştırmalarında Pearson ki-kare testi kullanılmıştır. Değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon katsayısıyla incelenmiştir. İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics® 22.0 programında yapılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p = 0.05$ olarak alınmıştır.

BULGULAR

Çalışma grubundaki hastalar ile sağlıklı gönüllüler arasında cinsiyet dağılımı karşılaştırılmıştır. Çalışma grubunda hastaların %65.6'sı ve sağlıklı gönüllülerin %62.5'i erkektir. Çalışma grubundaki hastaların yaşlarının, sağlıklı gruptaki katılımcılardan daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p = 0.001$). Çalışmaya dahil edilen akut bruselloz hastalarında PAD4 NETozis belirteç düzeyleri sağlıklı gönüllüler ile karşılaştırıldığında, tedavi öncesinde PAD4 ve NGAL seviyelerinin tedavi sonundaki ve sağlıklı gönüllülerinkinden daha yüksek olduğu bulunmuş ($p < 0.05$) ancak NE düzeyinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Tablo 1, 2). Tedavi sonrası 45. günde hastaların PAD4 ve NGAL seviyeleri ile sağlıklı gönüllüler arasında anlamlı bir fark yoktur (Tablo 3-5). Çalışma grubundaki hastalardaki klinik bulgular tablo olarak listelenmiştir (Tablo 6).

Tablo 1. Hastaların 0. gün ve 45. gün NE, PAD4 ve NGAL düzeyleri

Hasta Adı	PAD4 0. gün (ng/mL)	PAD4 45. gün (ng/mL)	NGAL 0. gün (ng/mL)	NGAL 45. gün (ng/mL)	NE 0. gün (ng/mL)	NE 45. gün (ng/mL)
Hasta 1	0.551	0	10.333	5.895	3.932	3.513
Hasta 2	0.513	0	11.106	6.081	2.975	3.207
Hasta 3	0.466	0	8.968	6.210	2.431	3.545
Hasta 4	0.569	0	9.117	6.263	2.656	3.745
Hasta 5	0.463	0	10.335	6.659	3.848	5.479
Hasta 6	0.547		11.085		3.135	
Hasta 7	0.501		10.705		2.334	
Hasta 8	2.372	0	10.579	6.512	4.283	4.406
Hasta 9	0.601		10.737		3.107	
Hasta 10	0.562		10.992		2.918	
Hasta 11	0.505		10.696		2.900	
Hasta 12	0.488		10.555		0.941	
Hasta 13	0.486	0	11.072	5.779	2.610	3.772
Hasta 14	0.505	0	10.936	6.367	1.414	3.141
Hasta 15	0.769	0	10.314	5.983	4.441	3.774
Hasta 16	0.496	0	9.444	3.734	3.566	5.313
Hasta 17	0.446		10.285		3.661	
Hasta 18	0.475		9.348		3.390	
Hasta 19	0.512	0	8.404	6.186	3.114	4.375
Hasta 20	0.509	0	10.460	6.533	3.336	3.700
Hasta 21	0.533	0	10.267	5.701	3.355	3.050
Hasta 22	0.553	0	9.389	5.719	3.188	4.297
Hasta 23	0.513	0	10.443	6.152	2.518	3.470
Hasta 24	0.528	0	10.459	6.007	3.153	2.419
Hasta 25	0.499		9.971		2.773	
Hasta 26	0.503		8.601		2.429	
Hasta 27	0.456		10.598		3.057	
Hasta 28	0.468		10.656		3.704	
Hasta 29	0.473		10.754		4.140	
Hasta 30	0.489	0	10.773	6.175	3.205	3.972
Hasta 31	0.463		10.274		3.903	
Hasta 32	0.532		9.683		4.962	
Hasta 33	0.467		9.065		3.248	
Hasta 34	0.477	0	9.668	6.252	3.922	4.958
Hasta 35	0.499	0	9.507	5.986	3.932	3.513
Hasta 36	0.472	0	10.230	5.895	2.975	3.207

Tablo 2. Sağlıklı kontrol grubunun NE, PAD4 ve NGAL düzeyleri

Kontrol Adı	PAD4 (ng/mL)	NGAL (ng/mL)	NE (ng/mL)
Kontrol 1	0	5.593	2.056
Kontrol 2	0	5.968	4.096
Kontrol 3	0	6.161	3.896
Kontrol 4	0	6.378	4.297
Kontrol 5	0	6.218	3.549
Kontrol 6	0	6.202	3.221
Kontrol 7	0	6.141	3.852
Kontrol 8	0	5.958	4.369
Kontrol 9	0	6.229	3.602
Kontrol 10	0	5.990	5.505
Kontrol 11	0	5.905	3.679
Kontrol 12	0	5.939	3.390
Kontrol 13	0	5.599	3.001
Kontrol 14	0	5.604	2.398
Kontrol 15	0	5.521	3.521
Kontrol 16	0	5.107	2.955
Kontrol 17	0	5.273	2.310
Kontrol 18	0	4.634	3.185
Kontrol 19	0.495	8.812	1.817
Kontrol 20	0.487	9.283	2.678

Tablo 3. Hasta grubunun 0. gündeki NE, NGAL ve PAD4 düzeylerinin değerlendirilmesi

	Grup	n	Ortalama ± Standart Sapma/Medyan (min-maks)	t/Z	p
NE 0. gün	Hasta	36	3.147 ± 0.799	-.962	0.341
	Sağlıklı	20	3.369 ± 0.876		
PAD4 0. gün	Hasta	36	0.5020 (0.45-2.37)	-5.809	<0.001
	Sağlıklı	20	0 (0-0.5)		
NGAL 0. gün	Hasta	36	10334 (8404-11106)	-6.036	<0.001
	Sağlıklı	20	5963 (4634-9283)		

Tablo 4. Hastaların 45. gündeki ile sağlıklıların NE, NGAL ve PAD4 düzeylerinin değerlendirilmesi

	Grup	n	Medyan (min-maks)	Z	p
NE 45. gün	Hasta	19	3.772 (2.419-5.479)	-2.009	.045
	Sağlıklı	20	3.455 (1.817-5.505)		
PAD4 45. gün	Hasta	20	0 (0-0)	-1.432	.152
	Sağlıklı	20	0 (0-0.5)		
NGAL 45. gün	Hasta	36	10334 (8404-11106)	-1.488	.137
	Sağlıklı	20	5963 (4634-9283)		

Tablo 5. Hastaların 0. gün ve 45. gündeki NE, NGAL ve PAD4 düzeylerinin karşılaştırılması

	Ölçüm	n	Ortalama ± Standart Sapma/Medyan (min-maks)	t/Z	p
NE	0. gün	19	3.170 ± 0.749	-3.780	.001
	45. gün	19	3.946 ± 0.804		
PAD4	0. gün	20	0.5 (0.45-2.37)	-3.920	<0.001
	45. gün	20	0 (0-0)		
NGAL	0. gün	19	10334 (8404-11106)	-3.823	<0.001
	45. gün	19	6163 (3734-10230)		

Tablo 6. Hastaların klinik bulgularının değerlendirilmesi

	n	%
İştahsızlık	14	38.9
Yorgunluk hissi	14	38.9
Ateş	10	27.8
Kas ağrısı	8	22.2
Bel ağrısı	8	22.2
Sıcak basması	7	19.4
Kalça ağrısı	6	16.7
Terleme	5	13.9
Küçük eklemlerde ağrı	5	13.9
Denge kaybı	5	13.9
Göğüs ağrısı	5	13.9
Sırt ağrısı	4	11.1
Tüm vücut ağrısı	4	11.1

TARTIŞMA

Bruselloz tedavi yanıtının izlenmesi önemlidir ancak mevcut laboratuvar belirteçleri sınırlıdır^[12]. Yetersiz tedavi nedeniyle çeşitli komplikasyonlardan ötürü hastalar kaybedilebilir. Bu nedenle bruselloz tanısında, izleme ve tedavisinde yeni belirteçlerin kullanılması gerekmektedir.

Brusellozda biyobelirteç araştırmaları devam etmektedir. Bu biyobelirteçler arasında nötrofiller, aday biyobelirteçler olarak öne çıkmaktadır^[13]. Nötrofillerin hücre dışı tuzaklar oluşturduğu NETozis, patojenleri öldürme mekanizmalarından biridir. NETozis, antikorlar, immün kompleksler, sitokinler, kemokinler, mikrokristaller ve diğer fizyolojik uyaranlarla tetiklenebilir^[14]. Nötrofiller patojenlerle karşılaştığında, öncelikle antimikrobiyal NET'lerin oluşumu için gerekli olan reaktif oksijen radikalleri üretir. Elastaz ve MPO granül-lerden çekirdeğe geçer, histon modifikasyonuna

yol açar. Sonuçta, nötrofil çekirdeği heterokromatin ve ökromatin ayırımı kaybeder, karakteristik lobüler yapısını yitirir, çekirdek zarı şişer ve granül zarlarının bozulması sonucu çekirdek, sitoplazma ve granüler içerikler karışır. Plazma zarı geçirgenliği artar ve kromatin salınır. Nihayetinde protein/histon bakımından zengin NET'lerin dışa salınımı gerçekleşir^[15]. NETozis, nötrofiller için bir hücre ölümü şekli olarak tanımlanır. Peptidil arjinin deiminaz 4 ve NGAL, NETozis ile ilişkili biyobelirteçlerdir^[16,17]. NETozis, hastalık şiddetini ve semptomları artırabilir; bu nedenle NETozis belirteçleri dolaylı prognostik faktörler olarak kullanılabilir^[18].

NETozis'in çeşitli otoimmün hastalıklar, pnömoni, COVID-19, sepsis, diğer infeksiyon hastalıkları ve kanserle ilişkili olduğu gösterilmiştir^[19-23]. Ancak literatürde NETozis'in bruselloz patogenezindeki rolünü kanıtlayan bir çalışma

yoktur. Ayrıca, ülkemizde bruselloz, T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından ulusal öncelikli zoonotik hastalık olarak ilan edilmiştir. En yüksek prevalans Doğu Anadolu'da görülse de yetersiz tanı ve bildirim nedeniyle kesin insidans ve prevalans bilinmemektedir. Bu nedenle, brusellozun tanı ve takibinde kullanılabilecek yeni belirteçlerin ve mekanizmaların değerlendirilmesi gereklidir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, bruselloz patogenezi hakkındaki anlayışa katkıda bulunacak ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutabilir.

Bruselloz tüm yaş gruplarında görülebilmekle birlikte bu çalışmada da tüm yetişkin yaş gruplarında gözlemlenmiştir^[24]. Minas ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, erkeklerin bruselloz geliştirme olasılığının kadınlardan daha yüksek olduğu belirtilmiştir^[25]. Bu çalışmada hasta grubunda erkeklerin sayısı kadınlardan daha fazladır ve bu veri literatürle uyumlu bulunmuştur.

Peptidil arjinin deiminaz 4, arginin kalıntılarının sitrullin polipeptitlere dönüşümünü katalize eder ve proteinlerin pozitif yükünü ortadan kaldırır. Pozitif yüklerin kaybı, kromatinin sıkı yapısının açılmasına ve kromatinin NET'ler şeklinde yoğunlaşmasına ve dağılmasına olanak tanır. Ek olarak, PAD4 sitoplazmadan çekirdeğe geçerek histonların sitrullinlenmesini katalize eder ve kromatin dekonkansasyonuna yol açar. Peptidil-arginin deiminazlar, Ca^{2+} bağlayıcı proteinler olup aktiviteleri Ca^{2+} tarafından uyarılır^[14]. Peptidil arjinin deiminaz 4 seviyeleri, tromboz, aterosklerotik kalp hastalığı, diyabet ve kanser gibi hastalık gruplarında araştırılmış ve bu hastalarda prognostik kriter olarak kullanılmıştır^[26-29]. Ancak literatürde bruselloz hastalarında tedaviyle birlikte PAD4 seviyelerinin değişim seyrini gösteren bir çalışma yoktur. Bu çalışmada, hasta grubunda tanı anında (0. gün) PAD4 seviyelerinin yüksek bulunması, hastalarımızdaki nötrofillerde histon dekonkansasyon sürecinin tanı anında mevcut olabileceğini düşündürmektedir. Dekondanse histonlar sayesinde kromozomların açıldığı ve kromatinlerin NET oluşum sürecinde kullanıldığı düşünüldükçe, NETozis mekanizmasının bruselloz hastalığında kullanılan bir mekanizma olduğu fikri desteklenmektedir. Ayrıca, tedavi sonunda ve sağlıklı gönüllülerde PAD4 seviyesinin nispeten düşük bulunması, antibiyotik tedavisiyle bakteriyel yükün azalması sonucunda geri besleme mekanizmaları

ile NETozis oluşumunun azaldığı şeklinde yorumlanması mümkündür.

Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin, bakteriyel infeksiyonlarda bulunan bir siderofordur. Diğer hücreler, özellikle nötrofiller tarafından da üretilir. Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin, birçok hastalığın etiolojisinde araştırma konusu olmaktadır. Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalinin NETozis sürecine dahil olduğu ve böbrek hastalıklarında özellikle böbrek epitelinde salgılandığı, hastalık sürecinde miktarının değiştiği ve akut böbrek hasarında plazma kreatinin ile ilişkili bir belirteç olarak kullanıldığı gösterilmiştir^[30,31]. Çalışmada, hasta grubundaki hastaların 0. gündeki NGAL seviyelerinin sağlıklılardan yüksek olduğu ve tedavi ile NGAL seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Sümer ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da bulgularımızı destekleyen bir sonuç bulunmuştur. Brusellozda antimikrobiyal aktivite için NETozis mekanizmasının kullanıldığının bir göstergesi olarak kabul edilmiştir^[30].

Nötrofil elastaz, bir serin proteaz olup ekstraselüler nötrofil tuzaklarında bulunur. Nötrofillerden salınan ve doğrudan sitotoksikite ve proinflamatuar mediyatör salınımını indükleyerek doku hasarına neden olan aktif bir enzimdir. Nötrofil hücre dışı tuzaklarda bulunmanın yanı sıra histonları parçalar ve kromatin dekonkansasyonunda rol oynar. Nötrofil elastaz, histon sitrullinasyonunda da rol oynar ve NE eksikliği olan farelerin NETozis mekanizmalarında işlev bozukluğu olduğu gösterilmiştir; dolayısıyla NE'nin NETozis sürecinde rol oynadığı bilinmektedir^[18]. Çalışmada, akut bruselloz tanısı alan hastalarda tanı anında (0. günde), NE serum seviyelerinin düşük olduğu, tedavi sonrası 45. günde ise serum seviyelerinin beklenmedik şekilde yüksek olduğu bulunmuştur.

Brusellozda NETozis sürecinin gösterilmesinin, bu hastalıkta tedavi ve takipte bu belirteçlerin seviyesindeki değişimin, takipte tedavi yanıtını göstermesi ve NETozis belirteçleri veya nötrofil fonksiyonlarını destekleyen tedavi seçeneklerinin geliştirilmesinin faydalı olabileceğini öngörmektedir. NETozis, birçok hastalık sürecinde etkili bir mekanizma olup, patojenleri temizleyerek olumlu bir etki sağlasa da enzimler ve proteinlerin salınımı ile yıkıcı etkiler göstererek doku hasarına yol açabilir^[32]. Bu nedenle, vitamin D ve non-steroid antiinflamatuar ilaçlar gibi NETozis'e dayalı tedaviler, kalıcı semptomları olan bu hastalar için

doku hasarının ilerlemesini engellemek amacıyla bir seçenek olabilir^[33,34]. Bu konuda yapılacak gelecekteki çalışmalar, NETozis'in inhibisyonunun yeni tedavi seçenekleri arasında olup olmayacağına ışık tutabilir.

Sonuç olarak, çalışma, bruselloz hastalığında NE, NGAL ve PAD4 NETozis belirteçlerini gösteren öncü bir çalışma olup literatürde daha önce gösterilmemiştir ve NE, NGAL ve PAD4 NETozis belirteçlerinin bruselloz tanısı ve tedavi yanıtının değerlendirilmesinde kullanılabilecek belirteçler olabileceğini işaret etmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınmıştır (Karar no: 2021/13-76, Tarih 29.06.2021).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

YAZAR KATKISI

Anafikir/Planlama: Tüm yazarlar

Analiz/Yorum: AÇİ, HC

Veri Sağlama: GB, HC

Yazım: Tüm yazarlar

Gözden Geçirme ve Düzeltme: AÇİ, HC

Onaylama: AÇİ, HC

KAYNAKLAR

- Liu Z, Gao L, Wang M, Yuan M, Li Z. Long ignored but making a comeback: A worldwide epidemiological evolution of human brucellosis. *Emerg Microbes Infect* 2024;13(1):2290839. <https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2290839>
- Almuzaini AM. An epidemiological study of Brucellosis in different animal species from the Al-Qassim region, Saudi Arabia. *Vaccines (Basel)* 2023;11:694. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030694>
- Buzgan T, Karahocagil MK, Irmak H, Baran AI, Karsen H, Evirgen O, et al. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: A retrospective evaluation and review of the literature. *Int J Infect Dis* 2010;14:e469-e78. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.06.031>
- Ardila MM, Cabarcas P, Flórez AA, Castellanos K, Beltrán C, Crisóstomo JC, et al. Bovine brucellosis in dual-purpose cattle herds and its potential economic impact in the Colombian Caribbean region. *Vet Res Commun* 2024;49(1):39. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10606-7>
- Herro R, Grimes HL. The diverse roles of neutrophils from protection to pathogenesis. *Nat Immunol* 2024;25(12):2209-19. <https://doi.org/10.1038/s41590-024-02006-5>
- Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005;23:197-223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>
- Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: Double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 2012;189:2689-95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>
- Rada B. Neutrophil extracellular traps. *Methods Mol Biol* 2019;1982:517-28. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9424-3_31
- Zhang Y, Li Y, Sun N, Tang H, Ye J, Liu Y, et al. NETosis is critical in patients with severe community-acquired pneumonia. *Front Immunol* 2022;13:1051140. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1051140>
- Shafqat A, Abdul Rab S, Ammar O, Al Salameh S, Alkhudairi A, Kashir J, et al. Emerging role of neutrophil extracellular traps in the complications of diabetes mellitus. *Front Med (Lausanne)* 2022;9:995993. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.995993>
- Wang H, Kim SJ, Lei Y, Wang S, Wang H, Huang H, et al. Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease. *Signal Transduct Target Ther* 2024;9(1):235. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01933-x>
- Yagupsky P, Morata P, Colmenero JD. Laboratory diagnosis of human Brucellosis. *Clin Microbiol Rev* 2019;33:e00073-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-19>
- Moreno E, Barquero-Calvo E. The role of neutrophils in Brucellosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2020;84:e00048-20. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00048-20>
- Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Mosc)* 2020;85:1178-90. <https://doi.org/10.1134/S0006297920100065>
- Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2020;36:191-218. <https://doi.org/10.1146/annurev-cell-bio-020520-111016>
- Claushuis TAM, van der Donk LEH, Luitse AL, van Veen HA, van der Wel NN, van Vught LA, et al. Role of peptidylarginine deiminase 4 in neutrophil extracellular trap formation and host defense during *Klebsiella pneumoniae*-induced pneumonia-derived sepsis. *J Immunol* 2018;201:1241-52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800314>
- Ling S, Xu JW. NETosis as a pathogenic factor for heart failure. *Oxid Med Cell Longev* 2021;2021:6687096. <https://doi.org/10.1155/2021/6687096>
- Ronchetti L, Boubaker NS, Barba M, Vici P, Gurtner A, Piaggio G, et al. Neutrophil extracellular traps in cancer: Not only catching microbes. *J Exp Clin Cancer Res* 2021;40:231. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02036-z>

19. Sanders NL, Martin IMC, Sharma A, Jones MR, Quinton LJ, Bosmann M, et al. Neutrophil extracellular traps as an exacerbating factor in bacterial pneumonia. *Infect Immun* 2022;90(3):e0049121. <https://doi.org/10.1128/iai.00491-21>
20. Zhu Y, Chen X, Liu X. NETosis and neutrophil extracellular traps in COVID-19: Immunothrombosis and beyond. *Front Immunol* 2022;13:838011. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.838011>
21. O'Brien XM, BM Biron, Reichner JS. Consequences of extracellular trap formation in sepsis. *Curr Opin Hematol* 2017;24:66-71. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000303>
22. Schultz BM, Acevedo OA, Kalergis AM, Bueno SM. Role of extracellular trap release during bacterial and viral infection. *Front Microbiol* 2022;13:798853. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.798853>
23. Shahzad MH, Feng L, Su X, Brassard A, Dhoparee-Doomah I, Ferri LE, et al. Neutrophil extracellular traps in cancer therapy resistance. *Cancers (Basel)* 2022;14:1359. <https://doi.org/10.3390/cancers14051359>
24. Gür A, Geyik MF, Dikici B, Nas K, Cevik R, Sarac J, et al. Complications of brucellosis in different age groups: A study of 283 cases in southeastern Anatolia of Turkey. *Yonsei Med J* 2003;44:33-44. <https://doi.org/10.3349/ymj.2003.44.1.33>
25. Minas M, Minas A, Gourgulianis K, Stournara A. Epidemiological and clinical aspects of human brucellosis in Central Greece. *Jpn J Infect Dis* 2007;60:362-6. <https://doi.org/10.7883/yoken.IJID.2007.362>
26. Zdanyte M, Borst O, Münzer P. NET-(works) in arterial and venous thrombo-occlusive diseases. *Front Cardiovasc Med* 2023;10:1155512. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1155512>
27. Franck G, Mawson TL, Folco EJ, Molinaro R, Ruvkun V, Engelbertsen D. Roles of PAD4 and NETosis in experimental atherosclerosis and arterial injury: Implications for superficial erosion. *Circ Res* 2018;123:33-42. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312494>
28. Shen Y, You Q, Wu Y, Wu J. Inhibition of PAD4-mediated NET formation by clamidine prevents diabetes development in nonobese diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2022;916:174623. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174623>
29. Shi L, Yao H, Liu Z, Xu M, Tsung A, Wang Y. Endogenous PAD4 in breast cancer cells mediates cancer extracellular chromatin network formation and promotes lung metastasis. *Mol Cancer Res* 2020;18:735-47. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0018>
30. Sümer Ş, Aktuğ Demir N, Demir LS, Fındık D, Kölgelir S, Ural O. Akut brusellozis ve brusellar spondilodiskitte serum nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin düzeyleri. *Mikrobiyol Bul* 2022;56:1-10. <https://doi.org/10.5578/mb.20229901>
31. Pezeshgi A, Abedi Azar S, Ghasemi H, Kamali K, Esmaeilzadeh A, Hajsalimi B, et al. Role of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an emerging biomarker of acute renal failure following kidney transplantation and its correlation with plasma creatinine. *J Renal Inj Prev* 2016;5:98-103. <https://doi.org/10.15171/jrip.2016.21>
32. Zhu S, Yu Y, Ren Y, Xu L, Wang H, Ling X, et al. The emerging roles of neutrophil extracellular traps in wound healing. *Cell Death Dis* 2021;12:984. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04294-3>
33. Handono K, Sidarta YO, Pradana BA, Nugroho RA, Hartono IA, Kalim H, et al. Vitamin D prevents endothelial damage induced by increased neutrophil extracellular traps formation in patients with systemic lupus erythematosus. *Acta Med Indones* 2014;46:189-98.
34. Lapponi MJ, Carestia A, Landoni VI, Rivadeneyra L, Etulain J, Negrotto S, et al. Regulation of neutrophil extracellular trap formation by anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2013;345:430-7. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.202879>

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Gamze BİNER

Ankara Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Hastanesi,
İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği,
Ankara, Türkiye

E-posta: lenfadenopati@gmail.com