

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
AİLE HEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI

**AKUT BRUSELLOZ HASTALARINDA PROLİDAZ
ENZİM AKTİVİTE DÜZEYLERİ**

Dr.Ahmet BAYAT
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Nurten AKSOY

ŞANLIURFA

2008

TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince hiçbir konuda desteğini esirgemeyerek beni teşvik edip yönlendiren Sayın Hocalarıma, başta tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Nurten AKSOY'a, ayrıca eğitimim süresince ve yaptığım çalışmalarım da her zaman destek ve katkılarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Erkan CEYLAN'a, Anabilim Dalı Başkanlığımızı yapmış olan hocalarım Prof. Dr. Fatma Sırmatel'e, Doç. Dr. Cengiz BÖLÜKBAŞ'a, Yrd. Doç. Dr. Elmas UZER'e, ve Yrd. Doç. Dr. Ali ATAŞ'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince büyük emekleri geçen bilgi, yetenek ve deneyimleri ile rehberlik eden değerli hocalarımdan İç Hastalıkları ve A.D. Başkanı Sayın Prof. Dr. Tevfik SABUNCU'ya, Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ali UZUNKÖY'e, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D Başkanı Sayın Prof. Dr. Himmet KARAZEYBEK'e , Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D. Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. F. Ferda VERİT'e, Kardiyoloji A.D. Başkanı Doç. Dr. Remzi YILMAZ'a ve hastanemizden ayrılmış olan Sayın Doç. Dr. Medaim YANIK'a en içten şükran ve saygılarımı sunarım.

Yardımları ile çalışmamı kolaylaştıran asistan arkadaşlarım Dr. Hale ÇAKIR'a, Dr. Ali Rıza OCAK'a, Dr. Leman KARAAĞAÇ'a, Dr. Fazilet DUYGU'ya, Dr. Turhan TOĞRUL'a ve 3 yıl boyunca kader arkadaşlarım olan başta bölüm arkadaşlarım olmak üzere, tüm rotasyon bölümlerinden asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Özellikle; hayatımın her aşamasında karşılık beklemeden arkamda olan ve evlatları olmaktan onur duyduğum değerli annem ve rahmetli babama ve yoğun tempoma ve nöbetlerime anlayışla ayak uyduran sevgili eşim Gülhan'ıma olmak üzere bu süreçte bana destek olan tüm aileme ve yakınlarıma da gönülden teşekkürler....

Dr. Ahmet BAYAT

2008

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii -iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER	1
1.1. Brusella Tarihçesi	1
1.2. Epidemiyoloji	2-3
1.3. Sınıflandırma	3-4
1.4. Görünüm ve boyanma özellikleri	4-5
1.5. Kültür özellikleri	5
1.6. Biyokimyasal özellikleri	6
1.7. Direnç özellikleri	7
1.8. Antijen yapısı	7
1.9. Patogenez ve klinik önem	8
1.9.1. Virulans ve patojenite	8-10
1.10. Klinik özellikleri	10-11
1.11. Komplikasyonlar	12-14
1.12. Tanı	14
1.12.1. Örnek toplama,saklama ve transportu	14
1.12.2. Örneklerin direkt incelenmesi	14
1.12.2.1. Direkt etyolojik tanı yöntemleri	15-17
1.12.2.2. İndirekt tanı yöntemleri	17-20
1.13. Tedavi	21-22
1.14. Korunma	22-23
2. PROLİDAZ	23
2.1. Prolidazın Tanımı	23
2.2. Prolin	23-26
2.3. Prolidazın Yapısı	26-27

2.4. İnsan Prolidazının Primer Yapısı ve Gen Lokalizasyonu	27-29
2.5. Prolidazın İzoenzimleri	30-32
2.6. Prolidaz İnhibitörleri ve Aktivatörleri	32
2.7. Prolidazın Kollajen Yapım ve Yıkımında Önemi	32-34
2.8. Prolidaz Aktivite Düzeyinin Ölçülmesinde Kullanılan Yöntemler	34-35
3. MATERYAL-METOD	36
3.1. Gereçler	36
3.1.1. Kullanılan Aletler	36
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	37
3.1.3. Prolidaz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar	38
3.2. Serum Prolidaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi (Optimize Chinard Metodu)	38-39
3.3. Prolidaz Aktivitesinin Hesaplanması	39-40
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43-48
6. KAYNAKLAR	49-55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Prolin ve diğler amino asidin genel yapısal görünümü	24
Şekil 2. Memeli kollajeninde bulunan prolin ve hidroksiprolin izomerleri	25
Şekil 3. Prolinin metabolik yollarla bağlantısı	26
Şekil 4. Prolidaz genini içeren kromozom 19	28
Şekil 5. Prolidaz cDNA'nın amino asit ve nükleotit dizisi	29
Şekil 6. Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinazın yeri	33
Şekil 7. Hasta ve kontrol grupları arasındaki prolidaz parametreleri	42

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Brucella türlerinin boya varlığında üreme özellikleri	6
Tablo 2. İnsan prolidaz I ve prolidaz II izoenzimlerinin doku dağılımları	30
Tablo 3. Hasta ve kontrol grupları arasındaki cinsiyet dağılımı	41
Tablo 4. Hasta ve kontrol grupları arasındaki prolidaz parametreleri	41

KISALTMALAR

ATP	Adenozin trifosfat
Ag	Antijen
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı

CO2	Karbondioksit
cDNA	Komplementer deoksi ribonükleik asit
DNA	Deoksi ribonükleik asit
ELISA	Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
E.Coli	Escherichia coli
H2O2	Hidrojen sülfür
IgA	İmmunglobulin A
IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
İM	İntramuskuler
KC	Karaciğer
Kİ	Kemik iliği
LPS	Lipopolisakkarit
Mn⁺²	Mangan
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RES	Retikülo endotelyal sistem
STA	Standart tüp aglütinasyon testi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. Brusella tarihçesi

Milattan sonra 79 yılında volkanik patlama sonucu harap olan eski bir Roma şehrinin kalıntıları arasında bulunan erişkin iskeletlerinde; brusellozun tipik kemik lezyonları bulunmuş olup; gömülü karbonize peynirlerin elektron mikroskopuyla yapılan analizinde *Brucella spp'*ye morfolojik olarak benzeyen kok benzeri formların varlığı tespit edilmiştir (1). Bruselloza benzer klinik durumlar; M.Ö. 450 yıllarında Hipokrat tarafından tarif edilmiştir ve humma olarak tanımlanmıştır. Ancak Brusellozun ilk uygun tarifi 1860 yılında cerrah olan Marston tarafından yapılmıştır (2,3).

İngiliz ordusunda doktor olarak çalışan Sir David Bruce etkeni ilk kez 1887 yılında, Malta'da hastalıktan ölen İngiliz askerin dalak dokusundan izole etmiş ve *Micrococcus melitensis* olarak adlandırmıştır (2). Danimarkalı veteriner Bang, 1895 yılında sığırlardan düşük etkeni olarak *Bacillus abortus'u* izole etmeyi başarmıştır (3). Maltalı doktor olan Zammit, 1905 yılında hastalığın rezervuarının keçiler olduğunu ve hastalığın insanlara bulaşmasında taze keçi sütünün rol aldığını belirtmiştir (3). 1918 yılında Amerikalı bakteriyolog Alice Evans Malta Ateşi ve Bang hastalığının etkenlerinin birbiriyle yüksek derecede benzer olduğunu göstermiştir. Kısa bir süre sonra bu iki türün morfolojik, kültür ve biyokimyasal özellikleri kıyaslanarak yapılan incelemelerinde bunların aynı cins içinde oldukları belirtilmiş ve Sir David Bruce'un anısına *Brucella* cinsi olarak adlandırılmıştır (4).

1914'de Traum domuz düşük materyalinde *B.suis'i*, 1966'da Carmichael köpeklerden *B.canis'i* izole etmişlerdir (3). *B.ovis* 1953'de koyunlardan, *B.neotomae* 1957' de ratlardan izole edilmiştir ve günümüze kadar bu iki türün insanlarda hastalık yaptığı gösterilememiştir (2). 1994'te *Brucella maris* olarak adlandırılan tür deniz memelilerinden izole edilmiştir (3).

Brusellozun tarihsel isimleri, "Ondülan ateşi", "Bang hastalığı", "Gibraltar hastalığı", "Akdeniz ateşi" ve "Malta ateşi" olarak da bilinmektedir (5).

Türkiye'de *B.melitensis* ilk defa 1915 yılında Kuleli hastanesinde bir erde tespit edilmiştir (6). Hastalık ilk olarak Malta adasında saptandığından "Malta Humması" veya "Akdeniz Humması" olarak isimlendirilmiştir. Hastalığa, klinik gidişindeki tipik ateş

trasesi nedeni ile “dalgalı humma” denmiştir. Ülkemizde bu hastalık; B.melitensis’in koyunlardan insanlara bulaşması nedeniyle “koyun hastalığı”, hastalığın hayvanlardan insanlara bulaşması nedeniyle de “mal hastalığı” gibi isimlerle anılmaktadır (2).

1.2. Epidemiyoloji

İnsanlarda hastalık etkeni olan Brucella bakterilerinden B.melitensis esas olarak koyun ve keçilerde; B.abortus daha çok sığır ve mandalarda; B.suis domuzlarda bulunur. Köpeklerde bulunan B.canis’in insanlarda hastalık yapması çok nadirdir (2).

B.abortus’un oluşturduğu sığır brusellozu çok yaygın form olma özelliğini korumakta ve B.melitensis’in oluşturduğu koyun ve keçi brusellozu ise insanlardaki en ciddi klinik tablo oluşturma özelliğini sürdürmektedir (7). Bruselloz; hastalığın esas kaynağını oluşturan evcil hayvanlarda süt verimini azaltırken hayvanlarda düşüklere neden olarak ekonomik kayba neden olmaktadır. Ergin ve gebe dişi hayvanlar bruselloza daha duyarlıdır. Etken dişilerde uterusu erkeklerde ise testise yerleşme eğilimindedir. Gebe hayvanlarda kotiledonlara yerleşip enfeksiyona neden olan etken yavrunun beslenmesini engelleyerek anne karnında ölüme veya düşüğe neden olmaktadır (2).

Bazı gelişmiş ülkelerde Bruselloz hayvanlar arasında tamamen eradike edilmiş olmasına rağmen ülkemizde hayvanlar arasında yaygın bir hastalıktır. Özellikle Ankara ovası, Konya yöresi, Güneydoğu Anadolu’da Diyarbakır ve Şanlıurfa’da yaygındır. Kırsal kesimde daha çok B.melitensis enfeksiyonu görülürken büyük şehirlerde daha çok B.abortus enfeksiyonuna rastlanır. Türkiye’de insanlardan en sık B.melitensis biyotip 3 izole edilmiştir ancak B.suis enfeksiyonuna ait yayın yapılmamıştır (2,8).

Bruselloz hayvanlarla yakın teması olan insanlarda (veteriner, çiftçi ve kasap gibi) veya süt ve süt ürünlerini taze tüketenlerde daha sık görülmektedir. Ülkemizde hastalık her yaş ve cinste görülmekle beraber en sık 15-35 yaş grubunda görülür. Yaz aylarında insanların kırsal kesime seyahat olanaklarının artması, süt ve süt ürünlerinden taze peynir ve krema tarzı yağların taze olarak elde etme olanaklarının bulunması nedeniyle enfeksiyon yaz aylarında daha sık olarak görülür (2).

Hastalığın insanlara bulaşmasında üç önemli yol bilinmektedir;

1) Kontamine et, süt ve süt ürünlerinin sindirim yolu ile alınması, ülkemizde en sık karşılaşılan bulaş yoludur. Genellikle pastörize edilmemiş, çiğ sütten yapılmış peynirlerin yeterince bekletilmeden yenmesi ile bulaş gerçekleşmektedir. Kaşar peyniri ve yoğurt gibi ısıtılarak veya fermentasyon ile hazırlanan besinlerle ise bulaştırılmazlar. Ülkemizde en sık bulaş çiğ sütten yapılan peynir, krema ve yağlarla olmaktadır.

2) İnfekte hayvanın genital salgı, düşük materyali veya idrarının btnliğ bozulmuş deri veya konjunktivaya direkt teması.

3) İnfeksiyöz aerosollerin inhalasyonu ile bulaş olabileceği dşnlmekte ve 10-100 bakterinin alınması bile hastalığa neden olmaktadır (2,9).

İnsandan insana bulaşma son derece nadirdir ve insan spermlerinden elde edilmiş olsalar bile cinsel yolla geçiş tartışmalıdır (10). Bruselloz laboratuvarından kazanılmış en sık etkenlerden biridir ve bruselloz vakalarının %2'sinin laboratuvar kaynaklı olduğu belirtilmektedir. Bulaşma genelde örneklerin korunmasız olarak tutulması, besiyerlerinin koklanması, ağızla pipetleme veya infekte aerosollerin göz, burun veya ağıza temasıyla olmaktadır (9,11).

Neden olduğu hastalığın ciddiyeti ve insanlar için uygun aşının yokluğundan dolayı biyoterörizm ajanı olarak kullanılabilir. Bazı brucella suşlarının B kategorisi biyoterörizm ajanı olarak dikkate alınmasından dolayı; hastalığın saptanmasında hızlı ve uygun tanı araçları üzerinde yoğun ilgi vardır (12).

1.3. Sınıflandırma

Brucella cinsinde bilinen altı tür vardır. B.abortus, B.melitensis, B.suis, B.canis, B.ovis ve B.neotomae. B.ovis ve B.neotomae dışındakiler insanlar için patojendir. Deniz memelilerinden izole edilen B.maris henüz sınıflandırmada yerini almamıştır (10).

Her bir Brucella türünün de biyokimyasal ve fizyolojik özellikleriyle birbirlerinden ayrılabilen çeşitli biyotipleri vardır. B.melitensis'in 3 biyotipi, B.abortus'un 7 biyotipi, B.suis'in 5 biyotipi ve diğer türlerin ise birer biyotipleri vardır (10). Brusella türlerinin biyotip düzeyindeki identifikasyonları için başlıca 4 ana test uygulanmaktadır. Bunlar

CO₂ gereksinimi, hidrojen sülfür (H₂S) üretimi, bazik fuksin ve tiyonin boya ları ile inhibisyona duyarlılık ve monospesifik A, M ve R serumları ile aglütinasyondur (8).

Filogenetik olarak Brucella cinsi; bakterilerin Rhizobiaceae grubuna aittir. Ayrıca Proteobacteria sınıfının α -2 alt sınıfında yer almaktadır ve bu sınıf ise Bartonella, Rochalimaea, Ochrobacterium ve Agrobacterium ile yakın ilişkilidir (9). DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları; bilinen 6 Brucella türü arasında %90'dan fazla benzerliği ortaya koymaktadır (13).

1.4.Görünüm ve boyanma özellikleri

Brucella cinsinde bulunan bakteriler 0.5-0.7 μ m eninde, 0.6-1.5 μ m boyunda, gram negatif, hareketsiz, sporsuz, küçük koku-basil veya kısa çomak şeklindedir. Küçük olduklarından, moleküler hareket nedeniyle, yerlerinde titreşirler (Braunien hareket). Çomaklar genellikle tek, daha az sıklıkla ikili, kısa zincirler veya küçük kümeler halinde görülür. Kapsülsüzdürler ancak S şeklinde ve mukoid koloni oluşturan suşlarda kapsül gösterilebilir. Pasajlarla ve R koloni şekillerinde bu kapsüller kaybolur. Aerop şartlarda ürerler ve mikroaerofil bakterilerdir. Glikozu az miktarda ütilize ederler. Gaz yapmazlar. Nitratları nitritlere indirgerler. CO₂ ile üremeleri arttırılır. Özellikle B. abortus ilk izolasyonda %5-10 CO₂'li ortama gereksinim duyar. Serum dekstroz agar veya diğer saydam besiyerlerinde 48 saatten sonra küçük, şeffaf, yüzeyden kabarık, yuvarlak ve düzgün kenarlı, nemli, parlak yüzeyli, şebnem tanesi görünümünde koloniler oluştururlar. Kolonileri hemolizsiz ve pigmentsizdir. B.melitensis ve B. abortus'un bazı türlerinin kolonileri, eski kültürlerde esmer renkte görülebilir. S koloni yapan türlerde R koloni yapan varyantlar olabildiği gibi, doğada sadece R koloni yapabilen türler de (B canis ve B. ovis) vardır. Optimal üreme sıcaklığı 37^o C (20-40^o C arasında üreyebilirler) ve optimal pH 6.6-7.4 arasındadır. Katalaz ve çoğu kez oksidaz olumludurlar. Kökenlerin çoğu üreyebilmek için çeşitli aminoasitler, tiamin, nikotinamid ve magnezyum iyonlarından zengin kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyarlar. Besiyerlerine kan ve serum eklenmesi üremeyi olumlu yönde etkiler. İndol ve asetil metil karbinol (Voges Proskauer) oluşturmazlar. Metil kırmızısı testi olumsuzdur. Brucella bakterileri ısıtılmaya, iyonizan radyasyona ve dezenfektanlara dayanıksızdırlar, canlılıklarını 56^o C

de yitirirler, 60^o C de ısıtılmakta 10 dakikada, %1 fenol eriyiğinde ise 15 dakikada ölürlür, sterilizasyondan emin olmak için 85^oC gerekir. Normal mide asidi mikroorganizmayı öldürmeye yeterlidir. Süt içinde 17 gün, tuzlanmış domuz etinde 3 hafta, dondurmada 1 ay, tereyağında 142 gün yaşadığı; insan idrarında en az 7 gün, çeşme suyunda 8^oC de 57 gün, 25^oC de ise 10 gün canlılığını koruduğu, düşük yapmış hayvan fetüsünde 75 gün, hayvan dışkısında açıkta 100 gün, toprakta 10 hafta, ahırların duvar ve döşemesinde 4 ay canlı kaldığı, keçi sütünden yapılmış peynirde soğukta 6 aya kadar, gübrede 2 yıldan daha uzun süre canlılıklarını sürdürebildiği bildirilmiştir. %10 tuz içeren salamura peynirde 45 gün, % 17 tuz içerende ise 1 ay yaşayabilir. Bu nedenle salamura peynirlerin yapılış tarihleri tenekelerin üzerinde yazılı olmalı ve tuz oranına dikkat edilmelidir, oda ısısındaki peynirde 2 ayda ölmektedir. Pastörizasyonla çabuk ölmelerinin epidemiolojik değeri vardır (10,14,15,16). Tulum ve kaşar peyniri uzun süre bekletildiği için, yoğurt ise asiditesi fazla olduğundan hastalığı bulaştırmazlar.

1.5. Kültür özellikleri

Brucella cinsi bakteriler insanlarda hastalığa neden olan diğer bakterilere göre daha uzun bir bölünme zamanına (2.5-3.5 saat) sahiptirler ve klinik örneklerden izolasyon için uzun süre (30 gün veya daha fazla) gerekmektedir (3,17). Brucella cinsi bakteriler organizmadan yeni ayrıldıklarında; besiyerinde yavaş ürerler ve ilk izolasyondan sonra buyyon ve jeloz gibi basit besiyerinde de üremeye alışırlar (18).

Kökenlerin çoğu üreyebilmek için zengin kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyarlar ve besiyerine kan veya serumun eklenmesi üremeyi olumlu yönde etkiler. Serum dekstroz agar veya diğer saydam besiyerlerinde ekimden 48 saat sonra koloniler oluştururlar (2).

Jelozdaki kolonileri küçük, yuvarlak, konveks, saydam, şebnem tanesine benzeyen kaygan ve S tipindedir ancak B.canis ve B.ovis ilk izolasyonlarında R koloni oluştururlar (10,18).

Pigment yapmazlar. B.melitensis ve bir kısım B.abortus kökenlerinin kolonileri zamanla esmer-kahverengi bir renk alır, hemoliz yapmazlar (4,18).

Zorunlu aerop olup respiratuvar tipte metabolizmaları vardır. Bazı kökenler (B.abortus ve B.suis'in birçok biovarı) üreyebilmek için özellikle primer izolasyonlarında CO₂'ye gereksinme duyarlar. Optimal üreme sıcaklıkları 37 °C (20-40 °C arasında üreyebilirler) ve optimal pH 6.6-7.4 arasındadır (2).

1.6. Biyokimyasal özellikleri

Karbonhidratlardan asit veya gaz yapmamakla beraber glikozu az miktarda kullanırlar. Jelatini eritmezler ve indol oluşturmazlar. Katalaz ve çoğu kez oksidaz olumludurlar. Nitratları nitritlere indirgerler. Asetil metil karbinol (Voges Proskauer) oluşturmazlar. Metil kırmızısı testi olumsuzdur. Üreaz aktivitesi değişken olup en yüksek B.suis'te görülmektedir (10,18).

Organik kükürtlü bileşikleri parçalama sonucunda Brucella'ların her üç türü de Hidrojen Sülfür (H₂S) oluştururlar. Ancak bunlar arasında B.suis en uzun süre (3-5 gün) ve en fazla miktarda, B.abortus orta süre (2 gün) ve az miktarda; B.melitensis ise en az süre (1 gün kadar) ve en az miktarda H₂S yapar (18).

Rusya'nın Tbilisi eyaletinde izole edilip Tbilisi (Tb) adı verilen faj son derece stabil olduğundan referans faj olarak tür tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tb fajı rutin test dilusyonunda (RTD) yani tam bir lizisin görüldüğü minimal faj konsantrasyonunda sadece smooth B.abortus kültürlerini lize eder (8).

Brucella bakterilerinin belirli boyalar ile olan ilişkilerinde de bazı farklar görülür. Bundan dolayı türlerinin ayırımında bu boyaların eklendiği özel besiyerleri (triptikaz soy agar veya triptoz agar) kullanılmaktadır. İnsan infeksiyonlarından en sık izole edilen üç türün; söz konusu olan bu boyalar varlığındaki üreme özellikleri Tablo1'de verilmiştir (18).

Tablo1: Brucella türlerinin boya varlığında üreme özellikleri

TÜR	Tiyonin (1/50000)	Bazik fuksin (1/25000)	Metil viyole (1/50000)	Pironin (1/100000)
B.melitensis	Ürer	Ürer	Ürer	Ürer
B.abortus	Üremez	Ürer	Ürer	Ürer
B. suis	Ürer	Üremez	Üremez	Üremez

1.7. Direnç özellikleri

Brucella cinsi bakteriler ısı, asit ve dezenfektanlara karşı dirençli değildir. İyonize radyasyon ve sık kullanılan dezenfektanlar bakterileri öldürmede yeterlidir. Pastörizasyon esnasında ölmelerinin epidemiyolojik değeri vardır (2,6,18).

60°C'de 10 dakikada, %0.1 fenolde 15 dakikada tahrip olurlar. Normal mide asidi bakteriyi öldürmede yeterlidir. Hayvanların barındığı ahır tozlarında 6 hafta, suda ise 10 hafta canlılığını sürdürebilir. Düşük yapmış hayvan fetusunda 75 gün, infekte çiğ süttten yapılmış dondurmada 30 gün, çiğ süttten yapılmış tuzsuz krema yağında buzdolabında 142 gün, %10 tuz içeren salamura peynirinde 45 gün, %17 tuz içeren peynirde ise 1 ay, toprakta 10 hafta, keçi sütünden yapılmış peynirde soğukta 6 aya kadar ve çiğ sütte 17 gün canlı kalabilirler (2,6,7).

Bu bakteriler; streptomisin, tetrasiklin, rifampisin, 3.kuşak sefalosporinler ve trimetoprim/sülfametoksazol'e (TMP/SMZ) duyarlı, penisilinlere dirençlidir (2).

1.8. Antijen yapısı

Aglütinin absorpsiyon ve jel difüzyon tekniği ile yapılan incelemelerde Brucella'larda

somatik A ve M antijenleriyle (Ag) bir yüzeyel L zarf antijeni bulunduğu gösterilmiştir. Daha çok B.abortus kökenlerinde bulunmuş olan L antijeni; organizmadan yeni ayrılan bakterilerde var olup onların immun serumlarla aglütinasyonuna engel olmakta ancak 100 °C'de 30 dakika ısıtıldıktan sonra ortadan kalkmaktadırlar. Bu özelliği ile Salmonella'lardaki Vi Ag'ye benzemektedir (3,18). Somatik A ve M Ag brucella bakterilerinde farklı oranlarda bulunmaktadır. B.melitensise daha çok M Ag ve daha az miktarda A Ag bulunmasına karşın; ve B.suis' te daha az oranda M Ag ve daha fazla A Ag vardır. Bundan dolayı aglütinin absorpsiyon testleri kullanılarak B.melitensisi diğerlerinden serolojik olarak ayırmak olanaklı iken B.abortus ve B.suis'i birbirinden ayırt etmek olanaksızdır (18).

1.9. Patogenez ve klinik önem

1.9.1.Virulans ve patojenite

Brusella bakterilerinin bilinen ekzotoksinleri yoktur. Brusella cinsi bakterilerden pek çok dış ve iç membran, sitoplazmik ve periplazmik antijenler identifiye edilmiş ve özellikleri saptanmıştır. Klinik olarak immünodominant olan yüzey antijeni Brusella Lipopolisakkarit (LPS)'tir ve pek çok serolojik tanı testinin temelini oluşturmaktadır. Brucella cinsine ait LPS; 4-amino, 4,6 dideoksimannoz içermektedir ve bu yapı nedeniyle E.coli O116, E.coli O157, Francisella Tularensis, Salmonella O30, Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia, Vibrio cholera O1 ve Yersinia enterocolitica O9 LPS'leri ile çapraz antijenisite gösterir (19).

Hücre duvarının bir komponentinin toksik olduğu tespit edilmiştir. Bu toksinin barsak bakterilerinin endotoksini ile benzer olduğu ve hastalık patogenezine yardım ettiği düşünülmektedir. Endotoksin niteliğindeki bu maddenin virulan ve avirulan suşlarda aynı yapı ve miktarda olduğu, fakat virulan suşlarda avirulan olanlara göre hücre içinde daha çabuk üredikleri belirtilmektedir. Endotoksine karşı duyarlı olmanın, hastalandırıcılıkta rolü olduğu sanılmaktadır. Ayrıca hayvanın fetüs zarlarında Brucellalar için bir gelişme faktörü olan eritrol yapısında bir madde saptanmış olup, gebe hayvanların Brusellalara karşı duyarlı olmaları bu şekilde açıklanmaktadır. İnsan plasentasında eritrol bulunmaz. Bundan dolayı insanlarda genellikle, brucella

enfeksiyonlarına bağı abortuslara rastlanmaz. Daha çok B.melitensis'de olmak üzere S-R varyasyonu ile birlikte geriye dönücü olmayan bir virülans azalması görülmektedir. İnekler çoğu zaman , bazen , nadir olarak da B. suis ile enfekte olurlar. Bu hayvanlarda enfeksiyon akut belirtiler ile birlikte veya bunları göstermeden septisemi şeklinde kendini gösterir ve mikroorganizmalar lenf nodülleri, dalak ve karaciğerin retiküloendotelial hücrelerine ve ürogenital sisteme yerleşir. Hayvanların sütü ile bakteriler bol miktarda dışarı çıkar. Sığırlar arasında enfeksiyonun yayılmasında en tehlikeli yol, sürüler içine karıştırılıp enfekte olan boğaların daha sonra suni tohumlama amacı ile kullanılmalıdır. Keçiler ise genellikle ile enfekte olurlar ve enfeksiyonun insana bulaşmasında en etkili kaynaktırlar. Zira bir keçi yaklaşık 6-7 ay kadar sürekli bakteri saçmaktadır. Koyunlarda enfeksiyon etkeni çoğu zaman B. melitensis, bazen de B. abortus veya B. suis'dir. Koyunlar, keçilere oranla etrafa daha kısa süreyle bakteri yayarlar. Domuzlar B. suis ile enfekte olmaktadır. Ayrıca, B abortus ve nadiren B melitensis hastalık oluşturabilmektedir. İnsanlarda B. melitensis, B. abortus, B. suis ve B. canis dışında Rusya'da çiftçiler arasında Ren geyiğinden kaynaklanan B. rangiferi terandi'nin oluşturduğu 1975 de 10 ve 1976 da 11 olgu bildirilmiştir (14).

Brusella cinsi bakterilerin insana bulaşması genellikle iki şekildedir :

1. Enfekte çiğ süt içilmesi veya süt ürünlerinin yenmesi.
2. Enfekte hayvanlar ile temas.

genellikle enfekte hayvanlardan elde edilen pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri ile özellikle keçi ve koyun sütünden yapılmış taze peynirler ile sindirim yolundan alınır. B. abortus'a oranla mide asiditesine daha dayanıklıdır. Isıtılmaya, iyonizan radyasyona ve dezenfektanlara dayanıksızdırlar. Pastörizasyonla ölürler (10). Mezbaha işçilerinde, hayvan kesicilerinde, et ile çalışan işçilerde ve veterinerlerde görülen bulaş şekli; bakterilerin özellikle eldeki çizik, sıyrık ve yaralardan vücuda girmesi şeklindedir. Enfekte hayvanların genital salgılarında da etken bulunmaktadır. Eldiven kullanmadan hayvan doğumuna müdahale eden bir veteriner hekimde, deri döküntüleri ile seyreden bir Bruselloz olgusu bildirilmiştir (14).

İnsandan insana bulaşma ise çok ender rastlanan bir olaydır. B. melitensis biyotip 2 ve biyotip 3 ile enfekte iki ayrı laboratuvar personelinin birinin eşinde, diğerinin nişanlısında Bruselloz tespit edilmiştir. Ayrıca Brusellozlu bir hastadan yapılan kemik iliği transplantasyonu ile ve enfekte annenin süt verdiği çocuğunda Bruselloz bildirilmiştir (14).

Brusella ağız mukozasından girerse lenf yolları ile boğaz lenf yollarında, barsak mukozasından geçerse mezenter lenf bezlerinde, konjunktiva ve deriden girerse bölgesel lenf nodüllerinde veya solunum yolundan inhalasyonla alınırlarsa mediastenik lenflerde yerleşir. Sonra Ductus Thorasicus yolu ile kana karışarak bakteriyemi meydana getirirler. Normal insan serumu bazı Brusella türlerine bakterisid etki gösterir ve polimorf nüveli lökositler tarafından fagosite olmaları için opsonize eder. B.melitensis serumun bakterisid etkisine dirençlidir ve bu etkenin diğer türlere göre daha virülan olmasını açıklar. Bakteriler lenf bezleri, karaciğer, kemik iliği ve diğer retiküloendotelial sistemde (mononükleer fagositer sistem) intrasellüler olarak çoğalırlar. Burada hızla ölebildikleri gibi çoğalarak fagositik hücreyi harap da edebilirler (20). Genelde fagositik hücreler içinde yaşamlarını sürdürürler. Bakteriler, fagolizozom füzyonunu engeller ve fagosite edilmelerine rağmen lizozomal enzimler ile ortadan kaldırılamazlar, lizozomal enzimlere dirençlidir. Adenin ve 5'-guanozin monofosfat üreterek nötrofillerin H₂O₂ oluşturmasını önlerler ve bu şekilde oksidatif mekanizmalara direnç gösterirler, sahip oldukları süperoksit dismutaz enzimi sayesinde reaktif oksijen metabolitlerini uzaklaştırarak oksidatif yıkıma karşı koyarlar. Konak hücre içinde kalıcı parazitlik, bir bakıma etkenin kendi saldırganlığına dayanabilmesi anlamına gelmektedir. Bu nedenle intrasellüler bakterilerin self-toksisitesi düşük olmaktadır. Hücre içinde yaşama, koruyucu immun cevabın niteliklerini belirgin şekilde etkiler. İntrasellüler bakteri infeksiyonlarında, humoral immunitenin yeri oldukça sınırlıdır; buna karşılık T lenfositlerinin belirlediği hücreyel immun yanıt konağın korunmasında önem taşır. T hücrelerinin başlıca görevi, infekte makrofajlarda, etkin antibakteriyel fonksiyonları aktive etmektir. Ancak çoğunlukla, beklenen bu olay gerçekleşemez ve intrasellüler bakteriler bu hücrelerde yaşamaya devam ederler (19). Moreno-Lafont ve arkadaşları (21), spesifik antijen veya poliklonal stimülasyona karşı oluşan immün cevabın değerlendirilmesi amacıyla yaptıkları çalışmalarında, hastaların CD4 ve CD8 T hücrelerinin RCM-BM antijenine cevap esnasında aynı derecede aktive ve proliferasyonu ve her iki T hücre subpopülasyonunun Brusellaya karşı immün cevapta önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Bakterilerin böbreklere yerleşmeleri sonucunda sürekli olarak idrarla atılım görülür. Yerleştiği RES organlarını büyütmesinin nedeni; büyük, tek nükleuslu hücrelerde progresif proliferasyondur. Hücre içerisinde üremekte olan bakteri, aynı zamanda antikör tehdidinden ve kullanılan antimikrobiyal ajanlardan uzun süre korunmuş olur. Bu nedenle tedavi uzun sürmektedir. Mikroorganizmaya karşı immünitenin gelişmesi ve makrofajların aktive olması ile mikroorganizmalar öldürülmeye

başlar ve bakterinin sahip olduğu hücre duvar yapısı (Lipopolisakkarit= endotoksin) kana dökülür. Organizmanın bu endotoksine yanıtı ile de hastalıkta görülen birçok belirti ortaya çıkar (19).

1.10. Klinik özellikleri

Bruselloz sistemik bir hastalık olması nedeniyle çok geniş bir klinik yelpazeye sahiptir. Genelde semptomlar nonspesifiktir. Yaklaşık 2-3 haftalık inkübasyon(bu süre 1 haftadan 3 aya kadar değişebilir) periyodunu takiben akut hastalık semptomları ortaya çıkar (3,22). Hastalık genellikle halsizlik, iştahsızlık, baş ağrısı, ateş, gece terlemeleri, myalji ve artralji ile başlar. Ateş, üşüme titreme ile 38-39⁰C'ye kadar çıkar. Hergün yarım derecelik artışlarla 40⁰C'ye yükselebilir. Ateşlenme genelde akşam üzeri ve gece olma eğilimindedir, gece yarısından sonra bol terleme ile düşer. Bazen 7-10 gün bu şekilde devam eden ateş,yükseldiği gibi yavaş yavaş düşerek 37⁰C'ye kadar iner, 3-5 günlük ateşsiz dönemi takiben ateşin tekrar yükseldiği görülür. Bu ateş şekli bruselloz için tipik Ondülan ateş trasesi olarak tanımlanmaktadır (3,10,23). Fizik muayenede, hastalarda %10-20 oranında lenfadenopati (LAP), %20-30 oranında da hepatomegali ve splenomegali izlenir. Belirli bir organ tutulumu ön planda ise hastalık fokal veya lokalizedir (3).

Bruselloz , her yaşta görülebilmekle birlikte tipik olarak genç ve orta yaşlı erişkinlerin hastalığıdır. 15-35 yaş grubunda görülme oranı en yüksektir. İnfant ve yaşlılarda daha az sıklıkla görülür (3,24). Hastalık, semptomların süresine göre; akut(8 haftadan kısa), subakut(8-52 hafta) ve kronik (2 haftadan uzun) olarak sınıflandırılmıştır (25,26).

1- **Akut form:**Bu tipik form olup, semptomlar 8 haftadan kısa sürelidir. Özellikle geceleri yükselen ateş, halsizlik, baş ağrısı, kilo kaybı, artralji, myalji, kabızlık, iştahsızlık, sırt ağrısı görülebilir. Fizik muayenede ateş (%95), hepatomegali (%20), splenomegali (%20-30), servikoaksiller bölgede hafif lenfadenopati (%12-20) vardır. Hastalarda genellikle lökositoz görülmez. Olguların üçte birinde lökopeni görülür. Bazı olgularda anemi, trombositopeni görülebilir. Sedimentasyon artışı hastaların %25'inde saptanabilir. Bu devrede kan kültüründe izolasyon siktir (3,25,26).

2- **Subakut form (Ondülan tip):** Semptomların süresi 8-52 hafta arasındadır. Bu gruba tedavi almamış, yetersiz tedavi almış ya da doğru olmayan tedavi almış hastalar girmektedir. Semptomlar hafif olup artrit daha sıktır. Genç erkek hastalarda orşit ve epididimit sık görülür. Sıklıkla hepatomegali vardır (25,26).

3- **Kronik form:** Hastaların şikayetlerinin 1 yıldan fazla (52 haftadan uzun) sürdüğü devre olup nüks ve komplikasyonların izlendiği dönemdir. Bu hastalarda fizik bulgular akut ya da subakut olgulardaki kadar fazla değildir. Halsizlik, yorgunluk, sinirlilik, uykusuzluk, emosyonel labilite, belli belirsiz kas ağrıları baş ağrısı gibi depresif belirtiler ön plandadır. Oküler hasar (episklerit, üveit) ve spondilit izlenebilir. Bu dönemde bakterinin izolasyonu kemik iliğinden yapılabilir; ayrıca düşük oranda kan kültüründen de izole edilebilir (3,25,26).

1.11. Komplikasyonlar

Brusella infeksiyonları akut sistemik belirtilerin yanı sıra veya bunlar olmadan lokalize organ tutulumlarıyla da ortaya çıkabilir (3).

1-Gastrointestinal sistem(GİS) bulguları: Hastaların %70'inde GİS semptomları bulunmaktadır. Bunlar arasında, iştahsızlık, karın ağrısı, bulantı, kusma, ishal veya kabızlık, kilo kaybı yer alır. B.melitensise bağlı kolit gelişebilmektedir (2,3).

2-Hepatobiliyer sistem: Karaciğer fonksiyon testlerinde minimal yükselme olur. B.abortusa bağlı infeksiyonda karaciğerde granülomlar meydana gelir. B.melitensis infeksiyonunda ise viral hepatite benzeyen nekroz alanının çevreleyen mononükleer hücre birikimi izlenir. Karaciğer ve dalakta süpüratif abse gelişimi B.suise bağlı infeksiyonlarda daha sık görülmektedir. Hepatik lezyonlar antimikrobiyal tedavi ile düzelir. Nadir olarak da akut kolesistit, pankreatit ve spontan bakteriyel peritonite sebep olmaktadır (2,3,25).

3-Kas-iskelet sistemi bulguları: Brusellozda osteoartiküler tutulum %20-60 oranında bildirilmiştir. Kemik ve eklem lezyonları içinde, artrit, spondilit, osteomyelit, tenosinovit ve bursit yer almaktadır. Bildirilen en sık komplikasyon sakroileittir. Kalça, diz, ayak bilekleri gibi büyük eklemler daha çok tutulur (3,27). Çoğu olguda tutulum monoartikülerdir, hastalarda sıklıkla gece ağrıları ve lasek testi pozitifliği vardır (25).

Bruselloz artritinde eklem sıvısı incelendiğinde mononükleer hücrelerde artış vardır ve vakarın yarısında bakteri tespit edilebilmektedir. Bazı hastalarda ise dolaşan immün komplekslere bağlı reaktif postinfeksiyöz spondiloartropati meydana gelebilir (3).

Yaşa bağlı olarak olguların %3-15'inde spondilit meydana gelmektedir. Daha çok yaşlı hastalarda gözlenir ve genelde lumbal vertebralarda tutulur. Disk aralığının daralması ve epifizit erken bulgulardandır. En belirgin radyolojik bulgular içinde; vertebral korpusun anterosuperior kenarının erozyonu (pons belirtisi) ve vertebral disk aralığının daralması yer almaktadır (3,25). Spondiliti olan hastaların %10-20 kadarında paravertebral abse vardır (25). CT ve MR tetkiki genelde eklem hasarını, vertebral osteomyeliti ve paraspinal abseleri ayırt etmek amacıyla kullanılır (3).

Artrit ve sakroileit akut hastalıkta ve pediatrik hastalarda daha sık görülürken; spondilit, vertebral osteomyelit ve paravertebral abse sıklıkla kronik hastalıkta ve yaşlı hastalarda görülür (3).

4-Sinir Sistemi Bulguları: Brusellozda her ne kadar depresyon ve mental bozukluklar görülse de, santral sinir sistemine direkt invazyon olguların %5'inden azında görülür. Sinir sistemi komplikasyonları arasında; menenjit, ensefalit, miyelit-radikülonörit, beyin absesi, epidural abse, demyelinizan sendrom ve meningovasküler sendromlar yer almaktadır. Bunlar içinde en sık akut veya kronik menenjit görülür. Hastalıkta ilk belirti olabileceği gibi geç dönemde de ortaya çıkabilir. Vakaların %50'sinden azında ense sertliği meydana gelir. BOS incelemesinde lenfositik pleositoz vardır, protein seviyesi artmış, glukoz seviyesi normal veya azalmış bulunur. Gram boyama genelde negatiftir ve olguların 1/4 ünden azında kültür pozitifliği vardır. BOS'ta özgül antikorların varlığıyla tanı konur (3,5,25).

5-Kardiyovasküler Sistem: Olguların %2'den azında kardiyovasküler komplikasyon izlenir. Bunlar içinde; doğal ve prostetik kapak endokardite, miyokardit,

perikardit, septik embolizasyon ve aortik anevrizmalar yer almaktadır. En sık tutulan kapak aort kapağıdır. Bruselloza bağlı ölümlerin en sık nedeni brusella endokarditidir. Medikal+cerrahi tedavi gerekmektedir (3,26).

6-Solunum Sistemi Bulguları: Brusellozda pulmoner infeksiyon hematojen yayılım veya direkt inhalasyon yolu ile mikroorganizmanın alınmasına bağlı gelişir. Solunum sistemi bulguları akciğer abseleri, milier lezyonlar, hiler lenfadenopati ve plevral effüzyon şeklinde gözlenebilir. Nadiren balgamdan brusella identifiye edilebilir (3,26).

7-Genitoüriner Sistem: Renal tutulum olgularda nadir görülür. İnterstisyel nefrit, piyelonefrit, eksudatif glomerulonefrit ve IgA nefropatisi bildirilmiştir. Orşit brusellozlu erkeklerin %20'sinden fazlasında görülebilir. Bayanlarda ise nadiren salpenjit, servisit ve pelvik abse geliştiği bildirilmiştir (3). Brusella hayvanlarda plasentanın koryoamniyotik zarına yerleşerek (eritriol varlığı nedeniyle) düşüklere neden olmaktadır. İnsan plasentasında eritriol bulunmaması nedeniyle insanlarda bruselloza bağlı düşük riski, diğer bakteriyel infeksiyonların seyrinde görülebilecek düşük riskinden fazla değildir (2).

8-Hematolojik Komplikasyonlar: Bruselloza bağlı hematolojik bulgular içinde anemi, lökopeni, trombositopeni ve kanama bozuklukları yer almaktadır. Olguların %75'inde kemik iliğinde granülomlar (3), yetişkin hastaların %1'inde ve çocukların %4'ünde trombositopenik purpura tanımlanmıştır. Trombositopeni ağır olabilir ve bazı hastalarda steroid tedavisi veya splenektomiye ihtiyaç duyabilir (25). Hematolojik anormallikler genellikle geçici olup başarılı bir antimikrobiyal tedaviden sonra normale dönmektedir (3).

9-Deri Komplikasyonları: Deri lezyonları brusellozlu hastaların yaklaşık %5'in de görülmektedir. Çoğu geçici ve nonspesifik lezyon olup, raş, papül, ülser, eritema nodozum, petesi, purpura ve vaskülit görülebilir (3).

10-Göz Komplikasyonları: Üveit genelde geç ortaya çıkan bir komplikasyondur. Kronik iridosiklit, numüler keratit, multifokal karoidit ve optik nörit oluşabilir. Brusella

üveitinin immün yanıtı bağlı olarak geliştiği düşünölmektedir, bu nedenle sistemik ve topikal steroid tedavisi verilebilir (3,25).

1.12. Tanı

Hastalığın belirti ve bulguları özğün olmadığı için hastadan kapsamlı bir öykünün alınması önem taşımaktadır. Hastalığın erken ve uygun tanısı tedaviye erken başlanmasında önemlidir (9).

1.12.1 Örnek toplama,saklama ve transportu

İnsan brusellozunun tanısında en uygun örnekler; kültür için kan ve Kİ; serolojik testler için ise serumdur. Brusella ayrıca dalak, KC ve apse örneklerinden de izole edilebilir. En uygun sonucu almak için ateşli dönemlerde birden fazla kan kültürü ve mümkünse antibiyotik kullanımından önce alınmalıdır. Alındıktan sonra 1 saat içinde işlenmeyecek örnekler buzdolabında saklanmalıdır. Akut faz serum örnekleri semptomların başlangıcından hemen sonra; konvelesan faz serum örnekleri ise 14-21 gün sonra alınmalıdır. Serum örneklerinin saklanması durumunda dondurulmalıdır. Eğer dondurma işlemi mümkün değilse serumun her ml'sine %1 lik 10 µl merthiolat eklenir (4).

1.12.2. Örneklerin direkt incelenmesi

Kan ve Kİ'nin direkt olarak mikroskopla incelenmesi tanıda yeterli derecede duyarlı değildir. Direkt Floresan Antikor Testi için uygun laboratuvar protokolü yoktur (4).

1.12.2.1 Direkt etyolojik tanı yöntemleri

Hastalık etkeninin kültürden izolasyonu veya nükleer materyallerin moleküler tanı teknikleriyle gösterilmesi temeline dayanan yöntemlerdir.

A. Kültür yöntemleriyle etkenin izolasyonu

Fakültatif hücre içi paraziti olan etkenlerin kültürden izolasyonu 5-7 gün arası bir zamanı gerektirmektedir. Rutin kültürler bir hafta boyunca takip edilerek süre sonunda üreme saptanamaması durumunda negatif sonuçlar bildirilir. Steril olmayan vücut bölgelerinden alınan örneklerin kültürünün kontamine flora bakterilerinin üremesini engellemek için seçici besiyerlerine yapılması uygun olmaktadır. Etkenler et ekstresi, triptoz, glikoz ve tuz içeren ortamlarda birçok türünün izole edilebilmesine karşın birçoğu da tiamin, niasin, nikotinic asit, biotin ve serum gibi maddelerin varlığında üreyebilmektedir. Brucella'ların üretiminde %5 koyun kanlı agar, triptoz agar, triptikaz soy agar, serumlu dekstroz agar, gliserol dekstroz agar ve kan kültür şişeleri kullanılan besiyerlerinden bazılarıdır. Tüm temel ortamlar Brucella dışındaki organizmaların üremesini engellemek için antibiyotik eklenerek seçici hale getirilebilir. Bu amaçla belirli oranlarda Polimiksin B, basitrasin, sikloheksimid, nalidiksik asit, nistatin, vankomisin içeren antimikrobik komplekslerin kullanılması uygun olmaktadır. Etkenin direkt izolasyonu için genelde katı besiyerleri tercih edilmektedir. Bu besiyerlerinin en önemli avantajlarından birisi gelişen bakteri kolonilerinin morfolojilerinin incelenmesiyle tanıya katkı sağlamasıdır (28). Etüv içindeki nem; uzamış inkübasyon süresi içinde besiyerinin yüzeyinin kurummasını engelleyecek derecede yeterli olmalıdır (9). Kan kültürleri sadece sıvı ortamlarda ve bifazik ortamlarda yapılabilmektedir. Castaneda besiyeri olarak bilinen nonselektif bifazik besiyeri; kan ve diğer vücut sıvıları ya da süttten Brucella izolasyonunda tercih edilen besiyeridir. Tekrarlayan pasajlarla kontaminasyondan kaçınmak için Castaneda tarafından geliştirilmiş katı ve sıvı besiyerlerinin aynı şişede olduğu kültür ortamlarıdır. Castaneda yönteminde kan örneği ekildikten sonra katı ortam üzerine sıvı besiyerinin geçmesini sağlayacak şekilde şişe eğdirilerek kanın besiyerine yayılması sağlanır. Şişe dik pozisyonda etüvde inkübe edilir ve üç gün boyunca her gün

incelenir. Katı kısımda koloni oluşumu halinde alt kültürler yapılır ve identifikasyona gidilir. Eğer koloni oluşmamışsa yine 3 gün boyunca inkübasyonda tutularak incelenir. Bu yöntemle kültür genelde 1 hafta içinde sonuç verir. 15 günden sonra pozitif sonuç almak nadirdir. Ancak olumsuz sonuçlar 35 günlük inkübasyondan sonra rapor edilir (17,28).

Bakterilerin izolasyon süresini kısaltmak amacıyla lizis konsantrasyon yöntemi uygulanmaktadır. Bu yöntemde hücre içi bakterilerin açığa çıkması sağlanır. Santrifügasyonla yoğunlaştırılan bakteri süspansiyonu agar içeren besiyerine ekilir (17).

İzolasyonda kısa sürede sonuç alabilmek amacıyla ticari otomatik kan kültür sistemlerinden de yararlanılabilir. Brusellozlu hastaların kan kültürlerinden bakteriyi izole etme oranı % 53.4-90 arasında değişmektedir ve kronik hastalarda duyarlılık oldukça düşüktür (17,29).

Kİ kültürlerinden pozitif sonuç alma süresi kan kültürüne oranla daha kısa olmaktadır. Bakterilerin kültürden izolasyonunu sınırlayan en önemli faktörlerin başında antibiyotik kullanımı gelmekte ve antibiyotik kullananlarda kan kültürlerinden önemli ölçüde hatalı negatif sonuçlar alınabilmektedir. Antibiyotik kullananlardan Kİ kültürlerinin yapılması durumunda daha olumlu sonuçlar alınmaktadır.

B. Moleküler yöntemlerle brusella DNA'sının aranması

Brusellozun tanısında 1990 yılından itibaren kullanılmakta olan PCR; duyarlılığının yüksek olması, hızlı olması, herhangi bir vücut dokusunda uygulanabilmesi ve bulaştıran 10 gün sonra bile pozitif sonuç vermesi açısından önemli bir gelişme olmuştur. Değişik hedef genler, primer çiftleri, PCR teknikleri ve ekstraksiyon yöntemleri hem hayvan hem de insan Brucella infeksiyonlarının tespitinde de kullanılmaktadır (30,31,32).

Bruselloz tanısında real time PCR kullanımıyla ilgili ilk çalışma Redkar ve ark. tarafından yapılmıştır (33).

Rt PCR testinin çalışması için; hedef DNA, iki primer, dört nükleotid trifosfat (dNTP), polimeraz enzimi, tampon çözelti içinde magnezyum iyonları gereklidir. Reaksiyon ısı döngüleriyle yapılmakta; çift zincirli hedef DNA'nın ayrılması (Denaturasyon) için ısı yükseltilir ve sonra primerlerin tek zincirli DNA'daki hedef bölgelere hibridizasyonu

sağlamak (annealing) için ısı düşürülür. Daha sonra polimeraz enzimi yardımıyla tek zincir DNA kalıplarına bağlanan primerler 5'- 3' yönünde uzatılır (Extension) (32,34).

Rt PCR'da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürünlerin varlığının saptanması; çift zincirli DNA arasına giren bir floresan boya veya floresan ile işaretli probler aracılığıyla yapılabilmekte bu amaç için Syber Green (SYBR Gren) veya floresan probler (TaqMan probu, Moleküler boncuk yöntemi, Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) hibridizasyon probu) kullanılmaktadır (35,36,37). PCR ile bruselloz tanısında Taqman probu; jel elektroforeze göre daha özgül bulunmuştur (38). Ayrıca *Brucella spp* tanısında multiplex rt PCR ve PCR-ELISA ile ilgili çalışmalarda yapılmıştır (39,40).

1.12.2.2 İndirekt tanı yöntemleri

Tanıda kullanılan serolojik testlerin birçoğu diğer bakterilerle çapraz reaksiyon veren antilipopolisakkarit antikorların tespitine dayanmaktadır (33).

A. Tüp aglütinasyon yöntemleri

a.) Standart tüp aglütinasyon testi (STA)

İlk kez Wright tarafından 1897 yılında uygulanan bu test çok ekonomik olması sebebiyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testte; *Brucella* bakterileri hızla antijen yapılarını değiştirdikleri için standart aglütinasyon veren S kökenlerinin ısı ile öldürülmüş fenollü süspansiyonları kullanılır (28,41). Test titresinin 1/160 ve üstü olması aktif infeksiyon için önemli bir kanıt olarak düşünülmektedir (42). Bu testte yalancı negatiflik sonuçları; prozon fenomeni, hastalığın erken döneminde olması ve blokan antikor varlığında gözlenebilir. Prozon'da; aglütinasyon, serumun düşük dilüsyonunda ve özellikle serumun yüksek titrede antikor içerdiği durumlarda maskelenebilir. Sıklıkla 1/20 dilüsyonda görülür; 1/80 ve üstü dilüsyonlarda nadirdir (30,41). Yalancı pozitif sonuçlar ise *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O116 ve O157, *Salmonella urbana*, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Xanthomonas maltophilia* ve *Afipia chevelandensis*'e karşı oluşan antikorlar ile çapraz reaksiyona bağlıdır (30). Yalancı pozitif ve negatif

sonuçlar sulandırımının 1/320 den daha fazla yapılmasıyla nlenebilir (3). Bu testin en büyük dezavantajı hastalıktan sonra titrenin uzun süre yüksek kalmasından dolayı hasta takibinde kullanılamamasıdır. Diğer bir dezavantajı ise bu testin B.canis infeksiyonu tanısında kullanılmamasıdır (30).

b.) 2-Merkaptoetanol ve Rivanol (Diamino 6,9 Etoxy acridin) Testi

Bu testler; immunglobulin (Ig)M pentamerinin disülfit bağlarınının indirgenmesini temel alır ve serumun bu maddeler ile muamelesi sonucu Ig M aglütinasyon yeteneğini kaybederken IgG etkilenmeden kalır. STA aglütinasyon yapan antikorların (Ig G ve Ig M) total miktarını belirlerken bu testler IgG miktarını tespitte kullanılır (28). Bu maddelerle işlem görmüş serumlarla yapılan aglütinasyon deneylerinin yine olumlu bulunması Ig G antikorlarına bağlı olup hastalığın kronikleştiği anlamını taşır (43). STA ile bu testin birlikte kullanımı akut olguların ayırt edilmesinde ve takibinde önemlidir (44).

c.) Coombs testi (CT):

Çok nadiren blokan antikorların varlığında negatif sonuç alınır ve bu durum Coombs testiyle saptanır (3). STA'da aglutinasyon vermeyen, Ig G sınıfından olan blokan antikorları tespit etmek için kullanılır (6,28).

B. Kompleman birleştirme testi

Hastalığın ileri evrelerinde veya kronik hastalarda predominant olan IgG antikorlarının tanısında; 1/64 ve üzerindeki titreler önemlidir (42). Antikomplementer aktivitenin ortaya çıkması, kompleman gibi kararsız reaktiflerin kullanılması, hastalığın

başlangıç dönemlerinde kompleman fiksasyonuna yanıtın tespit edilmesindeki yetersizlik ve teknik gereksinimler gibi dezavantajlara sahiptir (28,45).

C. Hızlı aglütinasyon testleri

Hızlı aglütinasyon testleri; Lam aglütinasyon testi ve Kart test yöntemidir. Bu testlerde alınan pozitif sonuçların STA ile doğrulanması gerekmektedir. Bu makroskopik aglütinasyon testlerinde boyalı bakteri süspansiyonları kullanılmaktadır. Boyalı brucella antijenleri kullanılarak tüpte aglütinasyon da (mikroaglütinasyon) araştırılabilir. Bu uygulamayla STA'a göre daha az antijen, daha az tüp dilusyonu ve daha kısa inkübasyon süresi avantajı sağlanır (28). Diğer bir hızlı test olan Rose Bengal testi (RB); STA ile oldukça uyumlu sonuçların alındığı tamponlanmış reaktifler ile düşük pH'ta (pH:3.65) aglütinasyon temeline dayanan tarama testidir. Ticari olarak kullanılan kitlerde B.abortus antijeni kullanılmaktadır ve bu testin duyarlılığı %96 ile %100 arasında değişmektedir (3,28,42).

Spot test özel yöntemlerle boyanmış antijenler ile tam kanda tanıda kullanılır (41).

D. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) Testi

Son zamanlarda özgül lipopolisakkarit antijenlerin kullanılması esasına dayanan ELISA yöntemlerinde; antijen olarak Brucella'ların tüm hücreleri, lipopolisakkaritleri, tuzla ekstrakte edilen proteinleri, nativ hapten polisakkariti ve dış membran proteinleri kullanılabilir (28,46).

Hastalığın başlangıcında özgül IgM, üçüncü haftadan sonra ise özgül IgG antikoru serumda saptanabilir. ELISA yöntemi akut ve kronik bruselloz tanısında Ig sınıflarının profilini veren, hızlı, duyarlı, özgül ve güvenilir bir yöntemdir ve geniş kitlelerin taranmasında uygundur (28,47).

Hastalığın seyri sırasında IgG, IgM, IgA antikor titrelerindeki değişiklikler ELISA yöntemiyle klasik serolojik testlerden daha iyi tespit edilir ve bu test kronik bruselloz tanısında iyi bir seçenektir (46,48).

E.Deri Testleri

Geç tip aşırı duyarlılık testleri bruselloz tanısında yardımcı olmakta, özellikle geviş getiren hayvanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsanlarda da kullanılan bu testlerde; antijen olarak öldürülmüş *Brucella* bakterileri, saflaştırılmış bakterilerin 21 günlük kültür süzüntüleri ve ticari olarak hazırlanmış saflaştırılmış rekombinant bakteri proteinleri kullanılmaktadır. Testte kullanılan antijenlerin lipopolisakkarit içermemesi gerekmektedir. Aksi halde diğer Gram negatif bakteri infeksiyonlarda çapraz reaksiyonlar alınması nedeniyle testin tanısal değeri olmaz. Brusellin alerjik deri testleri; tarama testi veya tamamlayıcı test olarak yardımcı olmaktadır. Brusellozun allerjik tanısında en sık kullanılan test 'Brucellergen' deri testidir. Brucellergen bir nükleoprotein kompleksi olup deri içine şırınga edildikten sonra 24 saat içinde injeksiyon yerinde kızarıklık, ödem ve sertlik meydana gelmesi durumunda kişinin *Brucella* bakterilerine karşı aşırı duyarlı olduğuna karar verilir (28).

F.RIA

Testte kullanılan anti-human antikorlar ¹²⁵Iodine ile işaretlenir ve *Brucella*'ya karşı oluşan antikorlar saptanır. Bu testin duyarlılığının yüksek olmasına rağmen kompleks olması ve radyoaktif madde kullanılması nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır (31,42).

G. Dipstick Test

İnsan serum örneklerinde Brucella spesifik IgM antikorlarının tespiti için basit dipstick testi geliştirilmiştir. Dipstick ısıya direçli antijeni; B.abortus 1119-2'nin sıvı kültürünün yıkanmış hücrelerinin 95°C'de ısıtılmasını takiben hücre kalıntılarının santrifügasyon ile kaldırılmasıyla hazırlanır. Hazırlanan bu preparat nitroselüloz banda belli bir çizgi olarak nitroselülozu kaplayarak uygulanmıştır. Testin sensitivitesi hastalığın ilk 2 ayında %89 ve hastalığın 2-4 aylarında %83.1 olarak bulunmuştur. Testin hesaplanan spesifitesi ise %98.6 olarak bulunmuştur. Testin uygulanmasının kolay oluşu, özel ve çok fazla deneyimli personel gerektirmemesinden dolayı saha kullanımı için uygun olduğu belirtilmiştir (49).

H. Brusellacapt Testi

Total anti-brucella antikorlarının immunocapture-aglütinasyon tekniği temelinde bruselloz tanısı için yeni bir testtir. Tanısal etkinliği Coombs testine eşittir (50).

1.13. Tedavi

Brusella cinsi bakterilerin intrasellüler karaktere sahip olmaları önemli tedavi sorunlarına yol açmaktadır, özellikle subakut ve kronik formda olduğu gibi bakteriyeminin nadir olduğu durumlarda sorun daha fazladır. Antibakteriyel ajanlar brusellozun tedavisinde semptomların süresini kısaltır ve komplikasyonların insidansını azaltır. Tam bir tedavi kültürü elde etmek ve relapsı önlemek için uzun süreli tedavi gereklidir; verilen antibiyotiklerin invitro aktivitelerinin olması ve de intrasellüler yeterli konsantrasyonlara ulaşabilmeleri gerekmektedir (3,25,51). Bruselloz'da tedavi yaklaşımlarında diğer bir gereklilik de,relaps riskini azaltmak ve hastalığın kronikleşmesini önlemek amacıyla kombine antibiyotik kullanımınıdır (25).

Tedavide en etkin ajanlar tetrasiklinlerdir. İlk seçilecek tedavi rejimi, doksisisiklin 2x100mg,oral (6 hafta) + streptomisin 1gr/gün, İM(3 hafta) kombinasyonudur. Bu kombinasyon relaps oranı en düşük tedavi rejimidir. İkinci seçilecek tedavi rejimi, doksisisiklin (2x100mg)+ rifampisin(1x600-900mg) (6 hafta)süreyle kombine kullanımıdır (3,25,52,53).

Dünya Sağlık Örgütü(WHO)nun önerisi de; doksisisiklin(200mg/gün)+ rifampisin(600-900 mg/gün)altı hafta veya doksisisiklin(200 mg/gün)altı hafta ile streptomisin(1 gr/gün-İM)üç haftadır (3).

Diğer aminoglikozitlerin kullanımına yönelik çalışmalar da yapılmaktadır, streptomisin yerine gentamisin (5 mg/kg/gün) veya netilmisin (10-14gün) kullanılabilir. Tobramisine in vitro direnç vardır (3,25,52,53).

Ko-trimaksazol, bruselloz tedavisinde başta monoterapi şeklinde uygulanmış, ancak yüksek relaps oranları nedeniyle terkedilmiştir. Ko-trimaksazol, rifampisin veya aminoglikozidlerle kombine edilerek 8 yaşından küçük çocuklarda, gebelerde, emziren annelerde ve tetrasiklin türevlerine intoleran hastalarda kullanılabilir (3,10,53).

Kinolonlar, hücre içinde geçişlerinin iyi olması nedeniyle bruselloz tedavisinde ön ve monoterapi olarak denenmiş, fazla relaps görülmesi üzerine kombine tedavi rejimleri içinde kullanımına başlanmıştır (3,53). Yine makrolitlerden azitromisin, brusella tedavisinde tek başına veya streptomisin ile kombine tedavileri hayvan çalışmalarında denenmiş, ancak standart tedavi rejimleri kadar başarılı bulunmamıştır (53,54).

Nörobruselloz tedavisinde doksisisiklin+rifampisin ve /veya ko-trimaksazol kombinasyonları tercih edilir. BOS'a geçişi iyi olan 3.kuşak sefalosporinler tedaviye eklenebilir. Streptomisin, santral sinir sisteminde terapötik seviyelere ulaşamadığından nörobrusellozda kullanılmaz (3). Tedavi süresi uzundur; en az üç ay olmak üzere, hasta iyileşene ve BOS bulguları normale dönene kadar tedavi sürdürülebilir (3,5,25).

Brusella endokarditinin tedavisinde ise doksisisiklin ile iki farklı ajanın kombine kullanılması gereklidir. Doksisisiklin + rifampisin ±ko-trimaksazol kullanılabilir. Çoğu vaka medikal tedaviye ilaveten cerrahi girişim de gerektirir. Her iki komplikasyonda da 6-9 aya varan tedavi süreleri uygulanır (3,25).

Sekiz yaşından küçük çocukların tedavisinde rifampisin + ko-trimaksazol (4-6 hafta) veya rifampisin (4-6 hafta) + gentamisin (5 mg/kg/gün) (5-10 gün) verilebilir. Gebelik ve

emzirme döneminde rifampisin + ko-trimaksazol veya rifampisin + gentamisin veya seftriakson kombinasyonları tercih edilmelidir (3,25).

Hepatik, splenik, paraspinal veya diğer yerleşimli brusellar apselerin tedavisinde medikal tedaviye ilaveten apsenin cerrahi drenajı sağlanmalıdır. Bu olgularda da tedavi süresi hastaya göre ayarlanmalıdır (25,54).

1.14 Korunma

İnsanlarda brusellozun önlenmesi özellikle koyun-keçi, sığır gibi evcil hayvanlarda hastalığın kontrolü ve endikasyonuna bağlıdır (3,55). Brusellozun korunma ve kontrolünde; kuzu ve oğlaklar 4-5 aylık iken B.melitensis Rev-1 aşısı ile aşılanmaktadır. Rev-1 aşısı ile aşılanan koyunlarda ikinci veya üçüncü gebeliğin sonuna kadar korunma sağlanmaktadır. Sığırlarda bruselloza karşı bağışıklık oluşturmak için B.abortus S-19 aşısı 4-8 aylık danalara uygulanmakta olup, bu aşı hayvanları 4.-5. gebeliğe kadar korumaktadır. Son yıllarda B.abortus biyotip-1'in rough kültüründen elde edilen RB-51 suşunun aşı aşı suşu olarak kullanılması önerilmektedir (3,56).

Özellikle kırsal kesimde yaşayan halkın bilgilendirilmesi tüketilen süt ve süt ürünlerinin kaynatılarak veya pastörize edilerek hazırlanması sağlanmalıdır (3,55).

Risk altındaki meslek gruplarının(mezbaha işçileri, et paketleyicileri, veterinerler, hayvan bakıcıları, laboratuvar çalışanları vb.) eldiven ve tüm kollarını örten giysiler giymeleri, gözlük takmaları alınacak önlemlerdendir (55).

Laboratuvar kaynaklı brusellozdan korunmak için brusella ile ilgili işlemler bakteriyolojik emniyet kabininde yapılmalıdır (22,57).

Brusellozlu olguların Sağlık Bakanlığı'na mutlaka bildiri yapılmalıdır. Aynı süt ve süt ürünlerini yemek-içmek ve hasta hayvan ile temas etmek aile içi bulaşa neden olmaktadır. Bu nedenle bruselloz tanısı alan kişilerin aile bireyleri taranmalı ve gerekirse tedavi önlemleri alınmalıdır. Ayrıca etler iyice pişirildikten sonra tüketilmelidir (55).

2. PROLİDAZ

2.1. Prolidazın Tanımı

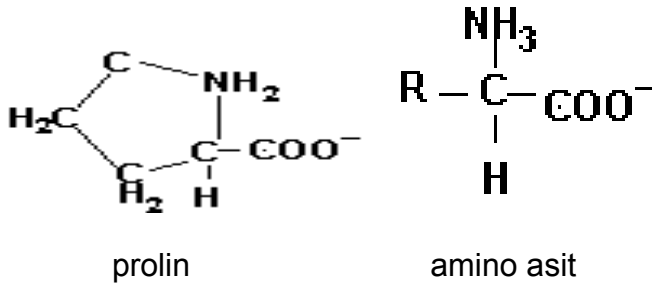
Prolidaz hidrolazlar sınıfına ait bir enzimdir (58,59). Uluslararası sınıflandırmaya göre; EC 3.4.13.9 sınıfında yer alır. Hidrolazlar çeşitli bağların hidrolizini kataliz ederler. Bu bağlar; C-O, C-N, C-C ve fosforik anhidrit bağı da içeren bazı bazlardır. Prolidaz enzimi karboksil terminal pozisyondaki prolin veya hidroksiprolin içeren dipeptitlerin hidrolizini katalizler.

1937 yılında Bergmann ve Fruton glisin-prolin'in önceden bilinen peptidazlardan farklı, intestinal mukozal bir enzim tarafından hidroliz edildiğini saptamışlardır (60). O tarihten itibaren prolidaz adı verilen bu enzimin pek çok memeli dokusunda varlığı gösterilmiştir (61,62). Enzim yaklaşık 60 yıl önce bulunmasına rağmen önemi 25 yıl önce eksikliği çalışmaları yapıldığında anlaşılmıştır (63).

2.2.Prolin

Prolin esansiyel olmayan bir imino asittir. Glutamatın halka yapısındaki bir türevidir. Prolin sentezinde glutamatın γ -karboksi grubunun ATP ile tepkimeye katılması sonucu γ -glutamilfosfat oluşmaktadır. Bunun NADPH ile indirgenmesi sonucu oluşan glutamat γ -semialdehit sonra kendiliğinden Δ^1 -prolin-5-karboksilat oluşturmak üzere halkalaşmakta ve bu yapı indirgenerek prolini oluşturmaktadır. Prolin katabolizmasında prolin oksidaz ile prolinden oluşan Δ^1 -prolin 5-karboksilat, glutamat γ -semialdehit ile ornitine transamine olabilmekte veya glutamata oksitlenmektedir (64).

Prolinin diğer amino asitlerden farkı R grubunun hem amino grubu hemde α karbon grubuna bağlı olarak siklik bir yapıya yol açmasıdır (Şekil-1).



Şekil-1. Prolin ve diğer amino asidin genel yapısal görünümü

Benzersiz yapısal özellikten dolayı prolin bir peptit sekansına girdiği zaman önemli konformasyonel özellikler gösterir. Bu aminoasidin siklik yapısı polipeptit omurganın yapısal yönlerine temel sınırlamalar getirmektedir. Prolin siklik yapısının sonucu olarak hiçbir fonksiyonel grup içermez ki bu durumda hidrojen bağına veya peptit bir bağı rezonans stabilizasyonuna katılmayı engeller bu nedenle prolin α helix veya β tabakalı sekonder yapılarına uyumlu olmayan tek amino asittir. Kemik, tendon ve destekleyici membran dokularını ana bileşeni olan kollejen prolinin yapısal özelliklerine belirgin bir şekilde bağlıdır (65).

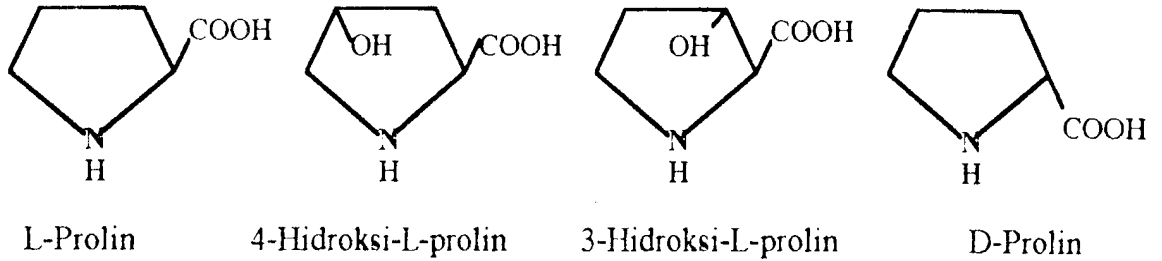
Prolinin siklik yapısı α karbon ve Nitrojenin bir peptit bağındaki rotasyon açısını sınırlamaktadır ki normal olarak bitişik amino asitlerin reel grupları arasındaki siterik engelleme veya elektrostatik repulsiyona bağlıdır. Prolin potansiyel bir yapı kırıcı olan ve peptit zincirlerinin yönünü değiştirme eğilimine sahip peptit zincir içine sabit bir eğim takdim eder. Proteinlerin yüzeyindeki ters bir dönüş veya saç tokası eğimi şeklinde önemli yapısal olayın proteinler içindeki en önemli sonucu prolin tarafından oluşturulmasıdır (66,67).

Prolin ve hidroksprolin, kollajen yapısında yer alan en önemli amino asittir. Prolin türevleri olan 3-hidroksprolin ve 4-hidroksprolin karışık fonksiyonlu oksijenazlar kullanılarak polipeptit zincirinde bulunan prolin kalıntılarından elde edilmektedir. Hidroksprolinin hidroksprolin oksidaz ile parçalanması sonucunda glioksalat ve pirüvat oluşmaktadır. Hidroksprolin hidrojen yapım ve yıkımında açığa çıkar (64).

Prolin biyolojik olarak aktif peptitlerin enzimatik degradasyona karşı koruma sağlamaktadır. Bu durum peptit veya protein prekürsörlerinin post transyasyonel modifikasyonlarının regülasyonunda açıkça bellidir. Polipeptit zincirinin içinde yerleşik

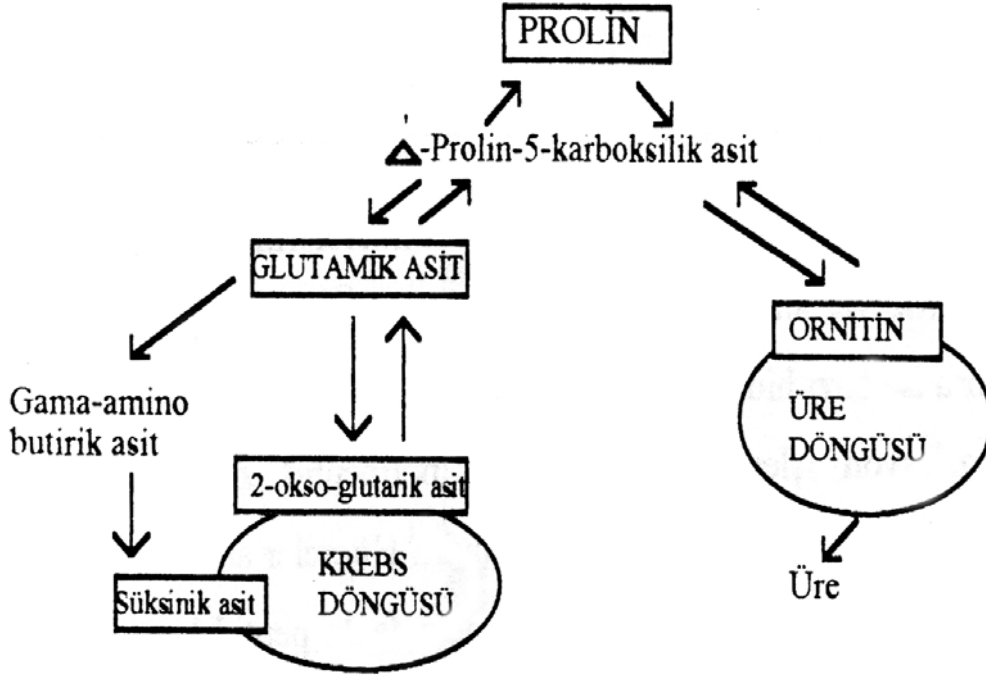
olan prolin amino asitler, zincirlerin enzimatik süreci öncesinde modifikasyon bölümünde bulunur ve polipeptit zincirinin hassasiyetine protelize sınırlayan yapısal unsurlar olarak hareket eder. Bu durum peptitlerin post-translasyonel modifikasyonunda görev alan ekzopeptidazların özelliği ile ilişkili araştırmalarda gösterilmiştir. Pek çok biyolojik olarak aktif peptitlerin amino ucuna yakın yerlerde ortaya çıkan prolin gözlemiyle desteklenmektedir (68,69).

Prolin ve hidroksiprolin prolidino halkasındaki azot atomuna bir hidrojen atomunun girmesi ile oluşmaktadır. Bunlar genelde imino asit ismiyle adlandırılır. L-prolin amino asitlerin hücre dışı havuzunun temel bileşenidir. Bunu sadece glutamin ve alanin amino asitleri takip eder. Hidroksiprolin öncelikle vücut sıvılarında oligopeptitlerde bulunmaktadır. İnsanlarda hidroksiprolinin yapısı 4-hidroksi –L-prolin şeklindedir ve vücut sıvılarında daha az bulunur. Protein yapısında bulunan hidroksiprolin peptide bağlı prolinin hidroksillenmesi ile oluşmaktadır (70).



Şekil-2. Memeli kollajeninde bulunan prolin ve hidroksiprolin izomerleri

Prolin ayrıca Krebs ve üre döngüsüyle metabolik olarak bağlantılıdır. Δ -prolin-5-karboksilik asit prolin metabolizmasında iki döngüyü birbirine bağlayan bir pozisyonudur. Prolinin karbon zincirinden Krebs döngüsüne geçişi, tüm dokularda bilinen klasik yoldan 2-oksaglutarik asit metabolizması ile olur (71).



Şekil-3. Prolinin metabolik yollarla bağlantısı (Scriver 1978) (71).

2.3.Prolidazın Yapısı

Prolidaz enzimi bir çok memeli dokusunda ve mikroorganizmalarda dağılım gösterir. Doğal, sitoplazmik, homodimerik bir metaloenzimdir. Mn^{+2} prolidaz enzimi aktivitesini 5-10 kat arttırmaktadır (K.E.66) (70). Mn^{+2} 'a ek olarak enzimin maksimum aktivitesi için aktif merkezinde arjinin ve anyonik amino asit artıklarının olması gerekir (70).

Proteazlar hep monomer yapıda olmasına rağmen tüm prolidazlar dimer yapı gösterirler ve ancak bu şekilde katalitik aktivite gösterirler (72). Prolidaz glikoprotein yapısındadır ve ağırlık olarak %5 karbonhidrat içermektedir. Prolidazın saptanan sekonder yapısında α -heliks (%33), β -tabakalı (%41) ve 30 potansiyel beta bağlantı bölgelerine eşit bir şekilde dağılmış hidrofobik ve hidrofilik alanlar bulunmaktadır. Enzimin

primer sırası bilinen proteinlere benzemez fakat bazı sıraları (%29'dan fazlası) F₁-ATP az'ın α ve β subünitelerinin sırasına benzerlik göstermektedir (70,73).

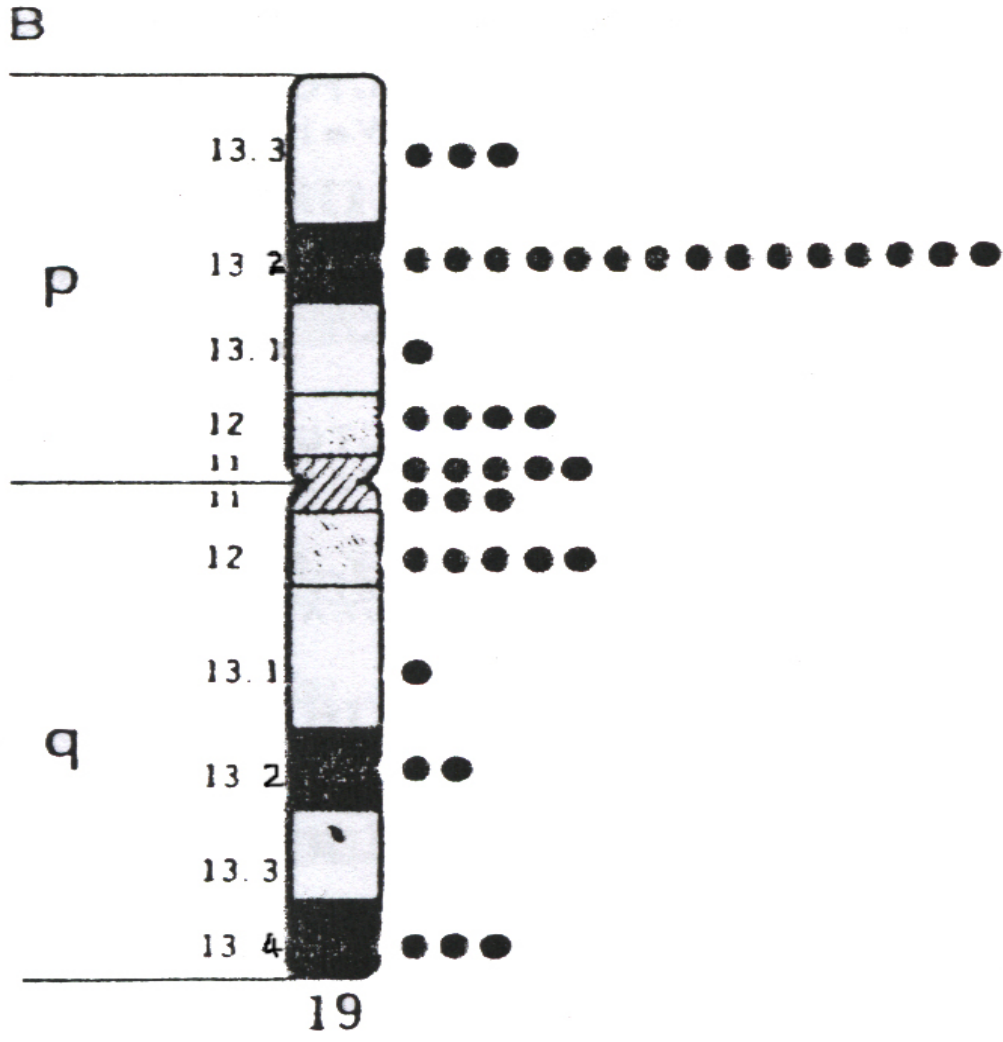
Prolidaz enziminin aktif merkezinde tiyol grubu yer alır ve bu grup bloke edilirse aktivite düşer. Bu da sisteinin enzimin aktivitesi için gerekli olduğunu gösterir. Doğal enzim için optimum Ph:7,6-7,8'dir ve izoelektronik nokta pH:4,4-4,5 olarak saptanmış olup bu değer yapıdaki asidik amino asitlerin varlığını belirtmektedir (70). Enzimin karakteristiği araştırıldığında DEAE (Dietilaminitil selüloz dizi kromatografisi) kromatografisinde prolidazın iki pik verdiği görülür (72).

Bai Hu 1992 yılında yapmış olduğu çalışmada prolidazda her monomer için iki aktif bölgenin olduğunu saptamış ve enzimin duruma bağlı olarak bu iki aktif bölgenin substrat spesifikliğı ve Mn⁺² ile preinkübasyon ortamındaki aktivasyon bakımından da farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur (72).

2.4.İnsan Prolidazının Primer Yapısı ve Gen Lokalizasyonu

Prolidaz geni sembolü PEPD'dir ve insanda 19 numaralı kromozomun kısa kolunda lokalizedir (19p 13,2 bölgesi). İnsan cDNA 'sı 1482 baz çiftinin okunmasıyla oluşur bu da 493 amino aside karşılık gelmektedir (73). Enzimin komplementer DNA klonları insan karaciğeri ve plental cDNA bankalarında izole edilmiştir.

Prolidazın nükleotit sırası saptanmıştır. Enzim amino asit olarak X-Ala-Ala-Ala sırası ile başlamaktadır (74). Prolidaz geni (PEPD) polimorfik allelleri içerir, bu aktiviteyi engellemez ve nadir allelleri prolidaz eksikliğine neden olmaktadır (70). Amino asit sırasının saptanması ve gen lokalizasyonu enzimin eksikliğinin sebep olduğu kalıtsal hastalığın temelini anlaşılması bakımından önemlidir. Prolidazın genomik sırası oldukça geniştir. En az 130 kb ve 15 ekson içermektedir. Ekson intron bağlantılarındaki tüm konformasyonlar GT/AG kuralına uymaktadır. Kodlama sırası genomik sıranın % 2 'sinden oluşur. Ekson uzunluğu 45 bp'den 528 bp'ye kadar ulaşır.



Şekil-4. Prolidaz genini içeren kromozom 19(Endo ve Taloue 1989) (74).

-18 CCGGTGCCGGGCGAAC -1

+1 ATGGCGGGGGCCACCGGACCCTCGTTTTGGCTGGGGAATGAAACCCTGAAGGTGCCCTGGCGCTCTTTGCCTTGAACCGGCAGCGCCTG 90
+1 MetAlaAlaAlaThrGlyProSerPheTrpLeuGlyAsnGluThrLeuLysValProLeuAlaLeuPheAlaLeuAsnArgGlnArgLeu 30

K20 K23
TGTGAGCGGCTGCGGAAGAACCCTGCTGTGCAGGCCGGCTCCATCGTGGTCTGCAGGGCGGGGAGGAGACTCAGCGCTACTGCACCGAC 180
CysGluArgLeuArgLysAsnProAlaValGlnAlaGlySerIleValValLeuGlnGlyGlyGluGluThrGlnArgTyrCysThrAsp 60

ACCGGGTCTCTCTCCAGGAGTCTTCTTCTACTGGCGGTTCCGGTGTCACTGAGCCAGCGCTGCTATGGTGTCCATCGATGTTGACACT 270
ThrGlyValLeuPheLeuGlnGluSerPhePheHisTrpAlaPheGlyValThrGluProGlyCysTyrGlyValIleAspValAspThr 90

GGGAAGTCGACCCTGTTTGTGCCAGGCTTCTCTGCCAGCCATGCCACCTGGATGGGAAAGATCCATTCCAAGGAGCCTTCAAGGAGAAG 360
GlyLysSerThrLeuPheValProArgLeuProAlaSerHisAlaThrTrpMetGlyLysIleHisSerLysGluHisPheLysGluLys 120

K15
TATGCCGTGGACGACGCTCCAGTACGTAGATGAGATTGCCAAGCTCTGACGTCACAGAAGCCCTCTGCTCTCTCACTTTGCGTGGCGTC 450
TyrAlaValAspAspValGlnTyrValAspGluIleAlaSerValLeuThrSerGlnLysProSerValLeuLeuThrLeuArgGlyVal 150

AACACGGACAGCGGCGAGTGTCTGCAGGGAGGCTCCTTTGACGGCATCAGCAAGTTCGAAGTCAACAATACCATTCTCACCCAGAGATC 540
AsnThrAspSerGlySerValCysArgGluAlaSerPheAspGlyIleSerLysPheGluValAsnAsnThrIleLeuHisProGluIle 180

GTTGAGAGCGGAGTGTTTAAGACGATATGGAGCTGGAGGTTCTGCGCTATACCAATAAAATCTCCAGCGAAGCCACCGTGAGGTAATG 630
ValGluSerArgValPheLysThrAspMetGluLeuGluValLeuArgTyrThrAsnLysIleSerSerGluAlaHisArgGluValMet 210

AAGGCTGTAAAAGTGGGAATGAAAGAATATGGGTTGGAAAGCCTCTTCGAGCACTACTGCTACTCCCGGGGCGGCATGCCCCACAGCTCC 720
LysAlaValLysValGlyMetLysGluTyrGlyLeuGluSerLeuPheGluHisTyrCysTyrSerArgGlyGlyMetArgHisSerSer 240

K28 (Glu)
TACACCTGCATCTGCGGAGTGGTGAAGACTCAGCCGTGCTACACTACGGACACGCCGGAGCTCCCAACGACCGAAGCATCCAGAATGGG 810
TyrThrCysIleCysGlySerGlyGluAsnSerAlaValLeuHisTyrGlyHisAlaGlyAlaProAsnAspArgThrIleGlnAsnGly 270

GATATGTGCCTGTTGCACATGGGCGGTGAGTATTACTCTGTGCTTCCGACATCACCTGCTCTTTCCCGCAACCGCAAGTTCCTGCA 900
AspMetCysLeuPheAspMetGlyGlyGluTyrTyrSerValAlaSerAspIleThrCysSerPheProArgAsnGlyLysPheThrAla 300

GACCAGAAGCCCGTCTATGAGGCGAGTGTGCTGAGCTCCCGTGGCGTCAATGGGTGCCATGAAGCCAGGTGACTGGTGGCCTGACATGCAC 990
AspGlnLysAlaValTyrGluAlaValLeuLeuSerSerArgAlaValMetGlyAlaMetLysProGlyAspTrpTrpProAspMetHis 330

CGCCTGCTGACCOCATCCACCTGGAGGAGCTGGCCACATGGGCATCTGAGCGGCAGCGTGGACGCCATGGTCCAGGCTCACCTGGGG 1080
ArgLeuAlaAspArgIleHisLeuGluGluLeuAlaHisMetGlyIleLeuSerGlySerValAspAlaMetValGlnAlaHisLeuGly 360

GCCGTGTTTATGCCTCACGGGCTTGGCCACTTCTGGGCATTGACGTGCACGACGTTGGGAGGCTACCCAGAGGGCGTGGAGCGCATCGAC 1170
AlaValPheMetProHisGlyLeuGlyHisPheLeuGlyIleAspValHisAspValGlyGlyTyrProGluGlyValGluArgIleAsp 390

GAGCCCGGCTGCGGAGCCTGCGCACTGCACGGCACCTGGACCCAGGCATGGTGTCTACCGTGGAGCGGGCATCTACTTCATCGACCAC 1260
GluProGlyLeuArgSerLeuArgThrAlaArgHisLeuGlnProGlyMetValLeuThrValGluProGlyIleTyrPheIleAspHis 420

CTCCTGGATGAGGCCCTGGCGGACCCGGCCCGCCTCTTCTTAACCGGAGGTCTGCAGCGCTTTCGGGTTTTGGCGGGGTCCGC 1350
LeuLeuAspGluAlaLeuAlaAspProAlaArgAlaSerPheLeuAsnArgGluValLeuGlnArgPheArgGlyPheGlyGlyValArg 450

ATCGAGGAGGACGTCGTGGTGCATCGACAGCGCATAGAGCTGCTGACCTGCGTGCCTGCGGCACTGTGGAAGAGATTGAAGCATGCATGCCA 1440
IleGluGluAspValValValIleAspSerGlyIleGluLeuLeuThrCysValProArgThrValGluGluIleGluAlaCysMetAla 480

GGCTGTGAUAAGGCTTTACCCCTTCTCTGGCCCAAGTAGAGCCAGCCAGAAATCCAGCGCACCTGGGGGCTGGCCTTGCACCTC 1530
GlyCysAspLysAlaPheThrProPheSerGlyProLys***
K8 493
TTTTCGTGATGGGCGAGCTGCTGGTCACTCCAGTAGCGAGAGACGGCACCCAGAATCAGATCCAGCTTCGGCATTGATCAGACCA 1620

AACAGTGTGTTTTCCCGGGGAGGAAACACTTTTTTAATTACCCTTTTGCAGGCCACCCTTTAATCTGTTTTATACCTTGCTTATTAAT 1710

GAGCGACTTAAAAATGATTGAAAAATAATGCTGTCTTTAGTAGCAAGTAAAAATGTGTCTTGTCTGTCATTTATATTCCTTTTCCAGGAAAG 1800

AAGCATTCTGATACTTTCTGTCAAAAATCAATATGCAGAATGGCATTGCAATAAAAGTTTCTAAAAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1890

AA

Şekil-5. Prolidaz cDNA 'nın amino asit ve nükleotit dizisi (Endo veTanoue 1989)

(74).

2.5.Prolidazın İzoenzimleri

Dietiaminoetil selüloz dizi kromatografisi (DEAE) ile kültürlü deri fibroblastları ve normal insan eritrositlerinden ayrıştırılan prolidazın 2 formunun olduğu görülmüştür (75). Bunlar prolidaz I ve prolidaz II olarak isimlendirilmiştir. Bu iki izoenzim substrat spesifitesi ile bazı kimyasal özellikler bakımından farklılıklar gösterirler (76). Bu iki izoenzimi ilk izole eden Butterworth ve Priestman olmuştur (1985). Sonra Myara ve arkadaşları 1987 ve 1989 yılında (77,78), Ohhashi ve arkadaşları ise 1990 yılında izoenzimleri izole etmeyi başarmışlardır (64).

İzoenzimlerin molekül ağırlıkları saptanmış ve prolidaz I'in molekül ağırlığının 112 kDa olduğu ve birbirini tamamlayan eşit molekül ağırlığında 2 subüniteden oluştuğu (56kDa) bulunmuştur (64,76). Prolidaz II 'nin ise molekül ağırlığının 185 kDa olduğu ve birbirine eş iki subüniteden (95 kDa) oluştuğu gözlenmiştir (64,79,80).

Prolidaz I tüm insan dokularında bulunur.Yapılan çalışmalarda prolidaz I 'in tüm iminodipeptitlerle reaksiyona girmesine rağmen gly-pro dipeptitini tercih ettiği bulunmuştur. Cosson ve arkadaşları 1992 'de prolidaz II nin gly-pro dipeptidine karşı düşük bir aktivite gösterdiğini ve bu izoenzimin plazmada bulunmadığını kaydederek preinkübasyonun uzaması ile aktivitenin önemli ölçüde düştüğünü göstermişlerdir (66). Prolidaz II'nin en yüksek aktiviteyi gly-pro yerine met-pro 'ya karşı gösterdiği saptanmıştır (76).

Prolidaz I'i in vitro tespit etmek için optimum şartlar; 1Mm $MnCl_2$ konsantrasyonunda 24 saat $37^{\circ}C$ 'de preinkübasyon olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Mn^{+2} konsantrasyonunun yükseltilecek zamanın azaltılabileceğini ya da yüksek preinkübasyon ısı, düşük $MnCl_2$ konsantrasyonu ve düşük preinkübasyon zamanı kullanılabileceği kaydedilmiştir (81). Cosson ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda prolidaz I ve prolidaz II'yi kromatografik olarak ayırdıktan sonra izoenzimlerin farklı doku dağılımları gösterdiklerini bulmuşlardır (Tablo 2) (82).

Tablo-2. İnsan prolidaz I ve prolidaz II izoenzimlerinin doku dağılımları (%) (Cosmos ve Myara 1992)

	Prolidaz I	Prolidaz II
Karaciğer	53	47
Böbrek	62	38
İleum	53	47
Jejenum	53	47
Duadenum	42	58
Pankreas	22	78
Mide	42	58
Dalak	52	48
Beyin	36	64
Beyincik	44	56
Kalp	37	63
İskelet kası	34	66
Eritrositler	51	49

Araştırmacılar karaciğer kaynaklı prolidaz II'nin karaciğerde inhibe edildiğini saptamışlardır (64). Bu inhibisyona ise plazma proteinlerinin sebep olduğunu belirtmişlerdir. Haptoglobulin, α_2 makroglobulin ve α_1 antitripsinin prolidaz II'nin aktivitesinde etkili olmadığı fakat saf albuminin altı saatlik inkübasyondan sonra aktiviteyi ortadan kaldırdığı görülmüştür. Albuminin bu inhibitör etkisine dayanarak insan plazmasında prolidaz II'nin aktivitesinin olmadığı açıklanmıştır (82).

Saf insan böbrek prolidaz I'nin agaroz jel elektroforezindeki görüldüğü bölge α_1 globulin bölgesidir. İzoelektrik noktasının 4,65 olduğu titrasyon eğrisinden bulunmuştur. Bu nokta insan ve hayvan dokularındaki diğer prolidazlar içinde geçerli olmaktadır.

Çeşitli insan dokularından alınan prolidaz I izoenzimi tavşan immunglobulinleri ile çapraz reaksiyon verir fakat aynı immunglobulinler prolidaz II ile reaksiyon vermez. Bu durum hepatik fibrozis ve prolidaz eksikliği olan hastaların dokuları ve plazmalarından prolidaz I araştırmalarında bir spesifik immünoassay yöntem geliştirilebileceğini akla getirmiştir (81).

2.6.Prolidaz İnhibitörleri ve Aktivatörleri

Yapılan çalışmalarda enzimin aktivasyonu için gerekli olan Mn^{+2} iyonu yerine başka metal iyonlarının ilavesi ile inhibisyon olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalar domuz böbrek prolidazı üzerinde 1957 yılında yapılmıştır. Fe^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Ag^{+1} , Hg^{+2} , Pb^{+2} ve Pt^{+4} iyonlarının prolidazı inhibe ettiği bulunmuştur. Ortalama 0,001-0,0004 M aralığındaki konsantrasyonlarda glutatyon kullanıldığında optimal stabilizasyon ve aktivite sağlandığı ancak glutatyonun yüksek konsantrasyonunun inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur. Aynı araştırmacılar iyodoasetamin ve p-kloromerküri benzoatın da enzimi inhibe ettiğine değinmişlerdir (62).

Prolidazın substrat analogu olan asetilprolin ve trans-1,2 siklopentadikarboksilik asit tarafından kompetatif inhibisyonunda K_1 'in pH 'ya bağlı olarak izledikleri yolu araştırdıklarında enzimin fonksiyonel grubu ile substratın pKa: 6,6 'da bağlandığını bununla birlikte bu maddelerin inhibisyonunun farklı yollar izlediğini görmüşlerdir (83).

1988 yılında ise yapılan bir çalışmaya göre Mn^{+2} ve Fe^{+2} metal iyonlarının enzim aktivitesine önemli bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Bundan başka Co'nin Leu-Pro dışındaki substratlara karşı prolidazı inhibe eder. Cu^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} iyonlarının da enzimi önemli derecede inhibe ettiği gözlenmiştir (84).

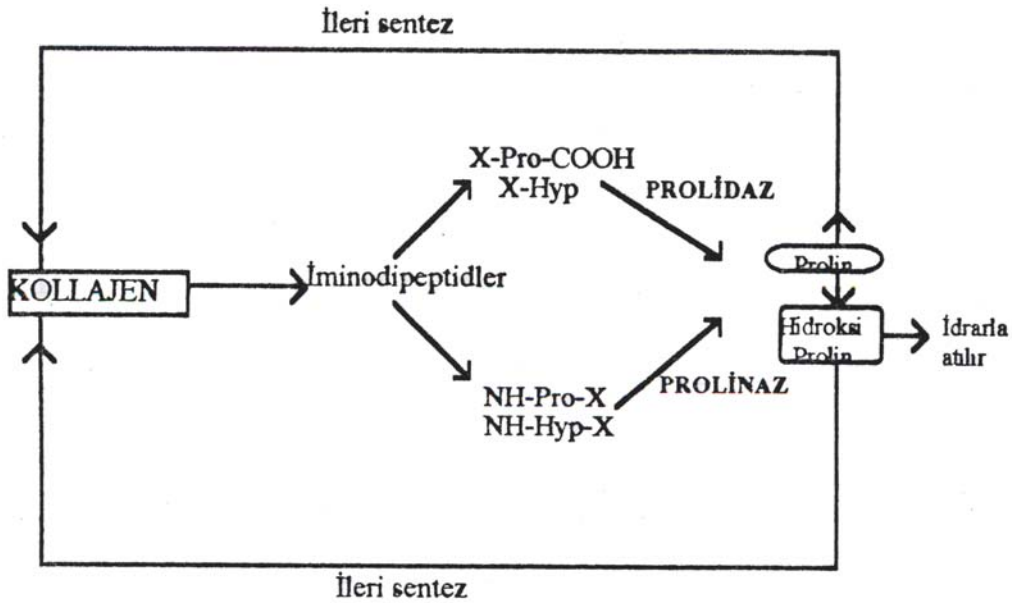
2.7. Prolidazın Kollajen Yapım ve Yıkımında Önemi

Kollajen yıkımı interstisyel kollajenaz enziminin kollajen molekülünün amino ucuna yakın bir yüzeyine bağlanmasıyla başlar. Üçlü sarmal yapıdaki kollajen molekülüne etkili

enzim orijinal kollajen molekülünün %25 ve %75 kadarını taşıyan iki adet sarmal yapıda molekül açığa çıkarmaktadır. Sarmal yapıları dayanıklı olmayan bu küçük moleküllerin vücutta parçalanması ile elde edilen polipeptitler, proteazlar tarafından daha küçük peptitler veya serbest amino asitlere yıkılmaktadır (64).

Prolidazın bütün biyolojik fonksiyonunun prolin döngüsüyle beraber kollajen dejenerasyon ürünleri ve diğer Xaa – Pro dipeptidlerin metabolizması olduğuna inanılmaktadır. Prolidaz C-terminalinde amino asidi prolin veya hidroksiprolin olan dipeptidleri hücre içinde hidroliz eder. Prolin yeniden döngüye girer ve yeni protein sentezinde kullanılırken hidroksiprolin idrarla atılmaktadır (58,85).

Kollajen dokudaki amino asitlerin yaklaşık %25'ini prolin ve hidroksiprolin oluşturduğundan, prolidaz kollajen yıkımında önemli rol oynamaktadır (86). Prolidaz hücre içi protein yıkımının son basamağında, özellikle yüksek miktarda prolin içeren prekollajenin yıkımı aşamasında rol oynamaktadır (81,82). Enzim için substrat kaynağı kollajen olup iminopeptidler kollajenin yıkımının son basamağında ortaya çıkmaktadır (87). Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinazın yeri aşağıdaki şekilde görülmektedir (Şekil-6).



Şekil-6. Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinazın yeri (Myara ve Myara 1984) (86).

Prolidaz beslenme ile alınan proteinlerden ve vücuttaki depo kollajeninden imino

asitlerin geri kazanılmasında önemli rol oynar (88). Prolidaz C-ucunda prolin veya hidroksiprolinin imino azotunu içeren peptid bağı bulunduran bileşiklerin hızla hidrolizini katalizleyen tek enzim olduğu için spesifitesi yüksektir (62). Prolidaz eksikliği prolinin normal döngüsündeki bozulmayla sonuçlanır. Prolidaz eksikliğinde büyük miktarda prolin ve hidroksiprolin üre ile dışarı atılır. İminopeptidler gibi amino asitleri bağlar ve sonuç olarak toplam prolin eksikliği oluşur. Prolidaz enzim aktivitesi eritrosit, lökosit ve fibroblastlarda çok düşüktür. Etkilenen hasta bireylerde prolidaz enzim aktivitesi saptanamaz. İminopeptiduri, aynı zamanda raşitizm, hiperparatiroidizm ve paget hastalığı gibi durumlarda tanımlanır. Fakat İminopeptiduri prolidaz eksikliğinde çok daha yüksektir.

Prolidaz eksikliği cilt ve diğer kollajen dokulardaki anormalliklerle karakterize bir sendromla sonuçlanır (89). İdrara salınan peptidler prolidaz için substrat olarak görev yaparlar (89). Bu nadir genetik prolidaz eksikliği otozomal resesif olarak kalıtımsaldır (90). Prolidaz geni başka bir kalıtımsal rahatsızlık olan miyotonik distrofi ile ilgili olması açısından önemlidir.

Prolidaz enzimi uzun zamandan beri bilinmesine rağmen önemi son yıllarda eksikliği çalışmalarıyla iyice anlaşılmıştır (89,91). Bu yüzden bu konuda az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğu da eritrosit prolidazı ile ilgili olup serum prolidazı hakkında çok şey bilinmemektedir. Prolidaz enziminin genetik eksikliğinin sonucunda mental gerilik , tekrarlayan infeksiyonlar ve deri lezyonları ile karakterize bir klinik tablonun ortaya çıktığı bildirilmiştir (88,92). Prolidaz eksikliği olan kişilerde prolidaz I aktivitesinin deri fibroblast kültüründe ve kan hücrelerinde azaldığı da gösterilmiştir (93).

2.8.Prolidaz Aktivite Düzeyinin Ölçülmesinde Kullanılan Yöntemler

Alparslan ve arkadaşları 1993 yılında viral hepatit, kronik aktif hepatit ve sirozlu hastaların serum prolidaz aktivitesini Chinard metoduyla ölçmüşlerdir. Bu hastaların serum prolidaz aktiviteleri bu metotla ölçülmüş ve değerleri kontrol grubundan anlamlı derecede farklı bulunmuştur.

1989 yılında yapılan bir çalışmada ise prolidaz eksikliğinin moleküler analizini yaptıkları çalışmada prolidaz aktivitesini fare monoklonal IgG'leri ile hazırlanmış agaroz kullanarak immün presipitasyon yöntemi ile saptamışlardır (73).

Radzicka ve grubu ise prolidaz inhibitörleri ile ilgili yaptıkları çalışmada, pH:6'da K⁺-MES (4-morfolino etanosülfirik asidin monopotasyum tuzu) tamponunda 222 nM'de Gly-Pro dipeptidinin kromofor grubunun kaybolması temeline dayanan devamlı spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemi Mock ve arkadaşları da, N-açıl prolinin prolidaz ile parçalanmasındaki pH'nın rolünü araştırdıkları çalışmada kullanmışlardır (83,85).

Başka bir çalışmada ise deri fibroblast kültürü ile elde edilen prolidazın aktivitesi kapiller elektroforez ile saptanmıştır. Ayrıca sonuçlar kolorimetrik bir yöntem olan Chinard ile de tekrarlanmıştır (94).

Bu konuda yapılan bir çok çalışmada enzim aktivitesi ölçümünde modifiye edilmiş Chinard yöntemi kullanılmıştır (59,95). Mustafa Gültepe ve arkadaşları prolidaz aktivitesi ölçüm yönteminin mutlak aktiviteyi yansıtmadığını araştırmışlar. Yöntemdeki mangan iyonları ile yapılan aktivasyon işleminin proteinlerin çöktürülmesi ve okuma basamaklarını incelemişler. Mangan içeren aktive edici reaktifin inkübasyon süresince stabil kalmadığını ve derişiminin enzim aktivasyonu için uygun olmadığını düşünmüşler. Bu nedenlerle, fotometrik yöntemin mangan derişimleri, ön inkübasyon solüsyonunun pH'sını en uygun hale getirmişler. Ortamda var olan ve prolidaz enzimi ile serbestleştirilen prolinin prolidaz enzimini inhibe edebileceği ve yöntemin analitik performansının etkilenebileceğini göstermişler. Sonuç olarak prolin inhibisyonundan en az etkilenecek hale getirilen modifiye(optimize) prolidaz ölçüm metodunun mutlak aktiviteyi daha iyi yansıtabilecek bir yöntem olabileceğini göstermişler (59).

Biz bu çalışmamızda yeni geliştirilen modifiye (optimize) chinard metodunu kullanmayı uygun bulduk.

3-MATERYAL –METOD

Bu çalışmamızda özetle; Harran Üniversitesi Tıp Fakültesine Araştırma ve Uygulama Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları poliklinik ve servisine başvuran ve Akut Brusella tanısı almış 35 gönüllü hasta, yaş, cinsiyet ve kiloları birbiriyle uyumlu, sigara içmeyen, brusella dışında herhangi bir sağlık sorunu olmayan kişiler hasta grubu olarak alındı. Ayrıca sağlıklı ve gönüllü 35 kişi, yaş, cinsiyet ve kiloları birbiriyle uyumlu, sigara içmeyen, herhangi bir sağlık sorunu olmayan kişiler kontrol grubu olarak alındı. Klinik olarak tüm hastalar detaylı bir şekilde genel fizik muayeneden geçirildi. Tüm hastalarda Brusella tanısı Rose-Bengal Tüp agglütinasyon ve Wright yöntemleri ile konuldu. Alınan kan örnekleri santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Elde edilen serum örnekleri çalışılincaya kadar –80 °C 'de muhafaza edildi. Çalışma günü serum örnekleri çözüldü ve prolidaz enzim aktivitesini değerlendirmek üzere kolorimetrik ölçüm yöntemi olan optimize Chinard yöntemi kullanıldı.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Aletler:

Santrifüj Universal 30 rf®

Vorteks DCA-VF-2®

Visible spektrofotometre Jasco V-530 UV/Vİ3 Spectrofotometri®

Hassas terazi Sartorius®

Su banyosu Nüve BM 402®

Derin dondurucu (-80 °C) New Brunswick Scientific®

pH metre Hanna®

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar:

<u>Madde Adı</u>	<u>Formülü</u>	<u>Firma ve Katalog no</u>
Prolin	$C_5 H_2NO_2$	Sigma P-0380
Glisil-Prolin	$C_7 H_2N_2O_3$	Sigma G-3002
Glasiyel asetik asit	CH_3COOH	Merck 541
Ortofosforik asit	H_3PO_4	Merck 564
Ninhidrin	$C_9H_6O_4$	Sigma N4876
Manganklorür (II)hidrat	$MnCl_2H_2O$	Merck5917
Trizma HCl	$C_4H_{11}NO_3HCl$	SigmaT-3253
Triklorasetik asit	$C_2HCl_3O_2$	Fluka 91232
Prolidaz(Porcine Kidney)	100 ünite 2.4 mg	Sigma P-6675
Serum fizyolojik		
Glutasyon	GSH	
Demir(II) klorür	$FeCl_2$	CarloErba 51575
Çinko Asetat (II) hidrat	$ZnC_4H_6O_4 \cdot 2H_2O$	Fluka 96458
Magnezyum klorür	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Riedel (IV) hidrat
EDTA (Triplex III)	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	Merck 8421
TRIZMA BASE	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma 93349

3.1.3.Prolidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan ayıraçlar:

1. 1 mM L-Prolin standartı 5mg/dl deiyonize su içinde hazırlandı
2. 1 mmol/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.132 g tartılıp pH:8 olan 0.05mol/L Tris tamponuyla litreye tamamlandı.
3. 1 mmol/L GSH ,50 mmol/L $MnCl_2$ içeren pH:7'de 50 mmol/L Tris HCl tamponu hazırlandı.(Ön inkübasyon çözeltisi)
4. Glisil - L prolin (144 mmol/ L): 144 mmol/L glisil-L-prolindipeptidi ön inkübasyon çözeltisinde eritilir. pH:7.8 'e ayarlanır.Taze hazırlanır.
5. Chinard çözeltisi: 0.5 mol/L'lik ortofosforik asit içerisinde 3 g/dL olacak şekilde ninhidrin 70 °C'de eritildi.
6. Serum fizyolojik hazırlandı.

3.2.Serum prolidaz aktivitesi ölçüm yöntemi (Optimize Chinard metodu):

Substrat olarak glisil-prolin kullanılarak enzim aracılığı ile oluşan prolinin asidik ortamda ısı etkisiyle ninhidrin ile renkli bir bileşik (pembe renk) oluşturma ilkesine dayanarak serum prolidaz düzeyi ölçülür. Rengin şiddeti prolin konsantrasyonuna bağlıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülür.



Deney 3 basamaktan oluşur:

1. Enzim aktivasyonu için; Numunenin Tris-HCl $MnCl_2$ ile preinkübasyonu
2. Örnek ile glisil - prolinin inkübasyonu
3. Serbestleşen prolinin spektrofotometrik olarak Chinard metodu ile ölçülmesi

Yöntemde,100 uL serum ile 100 uL serum fizyolojik karıştırılıp bu karışımdan 25 uL alınıp 75 uL ön inkübasyon solüsyonu ile 37 derecede 30 dakika inkübe edildi (preinkübasyon). Daha sonra inkübasyonlu ve inkübasyonsuz diye iki ayrı tüp hazırlandı ve aşağıdaki işlemler uygulandı.

<u>Ayıraçlar</u>	<u>İnkübasyonlu</u>	<u>İnkübasyonsuz</u>
100mM TrisTamponu	100uL	100uL
144mM Glisil - L prolin	100uL	100uL
Preinkübe edilmiş numune	100 uL	100 uL
Glasiyal asetik asit	-	500 uL

İnkübasyonlu tüpler 37 °C' de 5 dakika inkübe edildikten sonra 1000uL glasiyal asetik asit ilave edilerek reaksiyon durduruldu.Karışımın üzerine 300 uL Tris HCL tamponu (pH 7.8) ve 1000 uL optimize chinard solüsyonu eklendi ve karışım 90 derecede 20 dakika bekletildi.

<u>Ayıraçlar</u>	<u>Kör</u>	<u>Standart</u>	<u>İnkübasyonlu</u>	<u>İnkübasyonsuz</u>
Gasiyal asetik asit (ml)	1	1	1	1
Tris HCL pH 7.8 (uL)	300	300	300	300
Optimize Chinard reaktifi(mL)	1	1	1	1
Standart		1		

Yukarıdaki işlemler uygulandıktan sonra tüplerin ağzı kapatılıp 20 dk 90 °C 'de tutulur ve daha sonra buzlu su banyosunda soğutulup 515 nm'de okutulur (59,83).

3.3.Prolidaz Aktivitesinin Hesaplanması:

Prolidaz aktivite düzeyi : $\frac{(A-B) \times [S] \times \text{Faktör}}{S}$

S

A: İnkübasyon tüpü absorbans değeri

B: Sıfır zaman tüpü absorbans değeri(İnkübasyonsuz)

[S] : Standart konsantrasyonu (mmol/l)

S: standart absorbans değeri

Faktör : Preink. Ortamındaki sulandırma x İnk. Ortamındaki sulandırma

İnkübasyon zamanı

F: 40x15

30'

Prolidaz aktivite düzeyi : (A-B) x [S] x Faktör : 1 litrede 1 dakikada oluşan

S

mmol prolin miktarı

Prolidaz aktivite düzeyi : (A-B) x [S] x Faktör x 60 : 1 litrede 1 saatte oluşan

S

mmol prolin miktarı

Serumda aktivite tanımı : 1µmol substratı 1 dakikada değişikliğe uğratan enzim miktarı olarak yapılmıştır. Birim U/l olarak tanımlanmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Arastırma ve Uygulama Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları poliklinik ve servisine başvuran 35 gönüllü akut brusella tanısı konmuş hastadan yaş, kilo ve cinsiyetleri birbirine benzer nitelikte hasta grubu ile 35 kontrol vakası dahil edildi. Hasta ve kontrol grubundan alınan kan örneklerinin prolidaz enzim düzeyleri kolorometrik bir yöntem olan Chinard yöntemi ile ölçümü yapıldı. Hasta ve kontrol grupları arasındaki cinsiyet dağılımı Tablo.3 de gösterilmiştir. Tablo da gösterildiği gibi hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyet dağılımı açısından anlamlı bir farklılık görülmektedir. Hasta ve kontrol gruplarının serum prolidaz aktiviteleri Tablo 4'de gösterilmiştir.

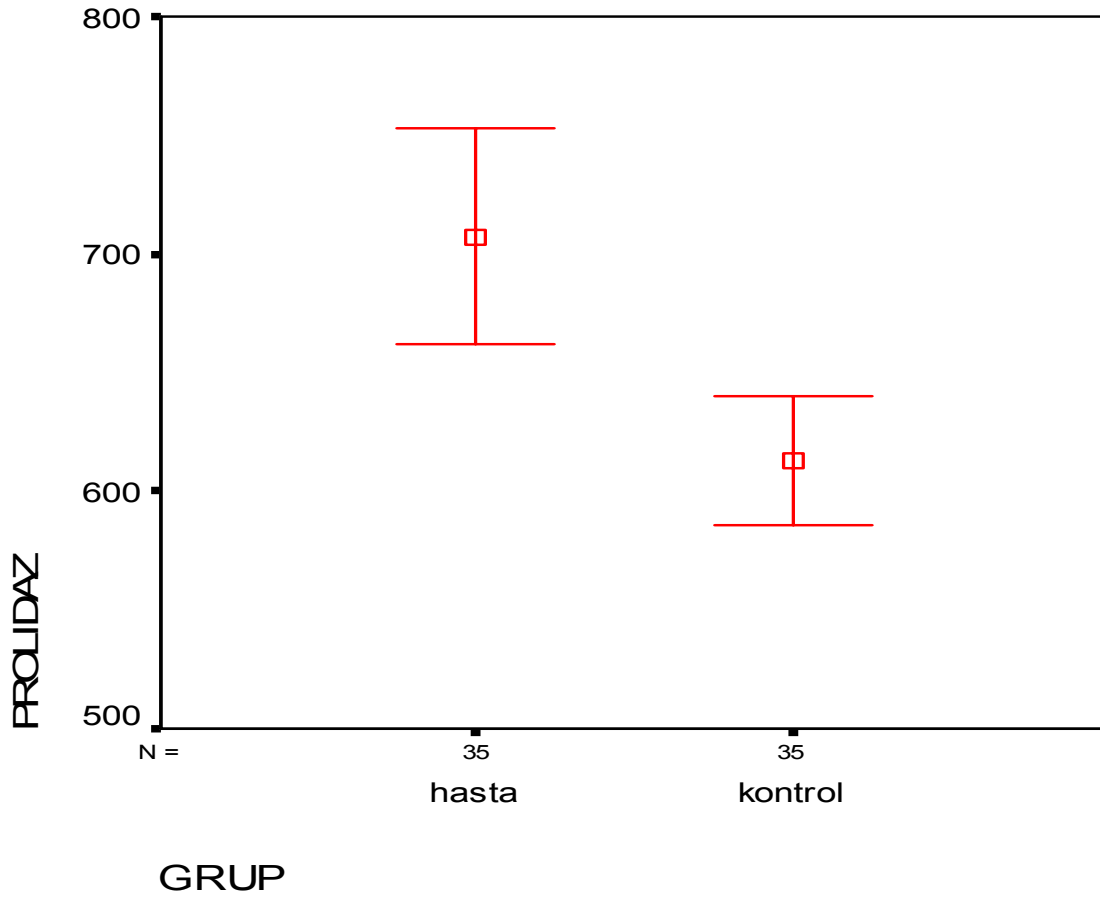
Tablo.3.Hasta ve kontrol grupları arasındaki cinsiyet dağılımı

Grup	Kadın	Erkek	Total
Hasta (n=35)	21	14	35
Kontrol (n=35)	16	19	35
Total (n=70)	37	33	70

Tablo-4. Hasta ve kontrol grupları arasındaki prolidaz parametreleri

	Hasta (n=35) Ortalama \pm SD	Kontrol (n=35) Ortalama \pm SD	P
Prolidaz (U/L)	707.2338 \pm 10.1	613.0011 \pm 4.0	P < 0.001

Şekil-7:Hasta ve kontrol grupları arasındaki prolidaz parametreleri



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biz bu çalışmamızda bruselloz hastalarında kollagen metabolizmalarında görülebilecek değişiklikleri incelemeyi hedefledik. Bruselloz özellikle gelişen ülkelerde evcil hayvanlar ve insanlarda görülen bir enfeksiyon hastalığıdır. Enfeksiyon Türkiye'de ve özellikle Güneydoğu Anadolu bölgesi'nde endemik olarak görülür (83). Türkiye'de hastalık her yaş ve cinsiyette görülmekte olup, hastalık görülme oranı 15-35 yaş arasında en yüksektir. Cinsiyetler arasında görülme sıklığı olarak belirgin bir fark görülmemektedir (96).

Bruselloz hastalığında kesin tanı kan, kemik iliği veya diğer enfekte dokulardan etkenin üretilmesiyle konur. Ancak bu oldukça güçtür. Kan kültüründe üreme oranının %20'den düşük olması ve üreme için çoğu kez 30 günden fazla zaman gerekmesi nedeniyle serolojik tanı yöntemleri daha büyük önem kazanmıştır. Günümüzde hızlı izolasyon yöntemleri kullanılarak tanı süresinin kısaltılmasına ve duyarlılığın artırılmasına çalışılmaktadır (27). Özellikle kronik brusellozis vakalarında kan kültürleri her zaman olumlu sonuç vermeyebilir. Böyle subakut veya kronik brusellozis vakalarında etkenin üretilmesi için kemik iliği kültürü önerilir. Lokal formlarda ise bölgeden alınacak doku, aspirasyon örnekleri, BOS ve lenf bezi biyopsi kültürlerinden mikroorganizmayı üretmek olasıdır (97). Brusellozisin akut döneminde önce IgM sınıfı antikorların artışı karakteristiktir. Yaklaşık 1-2 hafta sonra bunu IgG sınıfı antikorlarının artışı izler. Enfeksiyonun 3.haftasında iyi bir antikor yanıtı gelişir. İyileşme döneminde IgG sınıfı antikorların düzeyi birkaç ay içerisinde düşerken, IgM sınıfı antikorlar enfeksiyondan yıllar sonra bile serumda düşük düzeyde kalabilir. IgG antikorlarının kalıcı olması veya düştükten sonra tekrar yükselmesi persistan enfeksiyonu veya relapsı düşündürür (98,99). Bruselloziste kullanılan tüp aglütinasyon testine, Wright testi adı verilir. Bu testle IgM, ve IgG sınıfı antikorları alt tiplerinin ayırımı yapılamamaktadır. Rose Bengal testi, özel bir boya ile boyanan brusella antijenleri kullanılarak yapılan basit bir lam aglütinasyon testidir. Tam kan kullanılarak yapılan lam aglütinasyon testine ise spot test adı verilir. Tüm testler içinde en sensitif olanı ELISA'dır. Son dönemlerde indirek hemaglütinasyon testi, radyoaktif immüno deney (RIA), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemler de kullanılmaktadır (97). Rutin laboratuvar testleri tanısal değildir. Lokosit sayısı çoğunlukla normal veya azalmıştır. Eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) değişken sonuçlar verir. Anemi ve trombositopeni bulunabilir. Sinovyal sıvıda çoğunlukla

mononükleer hücreler hakimdir (98,99,100). Osteoartiküler komplikasyonları olan brusellozislilerde kan kültürü pozitifliği osteoartiküler tutulumu olmayan hastalara göre belirgin oranda düşük bulunmuştur. Serolojik testlerinin pozitiflik oranında, rose bengal titrelerinde ve indirek immüno flöresanda ise fark bulunmamaktadır (101).

Brusella enfeksiyonu insanlarda klinik bulguların geniş spektrum gösterdiği multisistem hastalık tablosu oluşturabileceği gibi yalnızca serolojik bulguların pozitif olduğu asemptomatik tablo da oluşturabilir (102). Semptomatik bruselloz vakalarında görülen klinik bulgular nonspesifik olup sıklıkla görülen bulgular; ateş, miyalji, yorgunluk, gece terlemesi, zayıflık/güçsüzlük, artalji ve hepatosplenomegalidir (103). Başvuru semptomlarının çeşitliliği nedeni ile miliyer tüberküloz, malarya, tifo gibi enfeksiyonların, lenfoma gibi malignitelerin ve erişkin başlangıçlı Still Hastalığı, sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit ve sarkoidoz gibi kollajen doku hastalıklarının ayırıcı tanısına girmektedir (102). Bununla birlikte brusella enfeksiyonu ile birlikte çeşitli farklı klinik görünüm (organ tutulumu ve diğer komplikasyonları içeren) bildirilmiştir. Değişik klinik görünüm bu enfeksiyonun tanısında yanılgılara yol açabilir (102). Bruselloz bu şekilde pek çok sistemi etkileyen bir hastalık olması nedeniyle vücudumuzda önemli birçok dokunun yapısında yer alan kollajenin metabolizmasını etkilemesi de çok olası gözükmektedir (102).

Kollajenler hayvansal dokuların ana bileşiği olup, vücutta en fazla bulunan proteindir (104). Diğer birçok dokuda olduğu gibi, karaciğerde de fibroblastlar tarafından sentezlenirler. Hepatositler ve presinüzoidal hücrelerin de kollajen oluşuna katıldığı düşünülmektedir (93). Kollajen, bağ doku iskeletinin temelini sağlar. Birçok hücre bir kollajen matriksin içinde bulunur. Hücre, kollajen ilişkisi; inflamasyon, hücre hareketi, yara iyileşmesi, trofoblast implantasyonu ve fetal gelişim için temeldir. Kollajenin aminoasid kompozisyonu, %33 glisin, %20-25 prolin ve hidroksprolin, %5-11 lizin ve hidrosilizinden oluşur. Ayrı genlerden oluşturulan en az 24α zincirinden oluşan, 15 tane kollajen vardır. Tip 1,2,3,5 ve 11 fibriller kollajen olarak isimlendirilir. Yetişkinlerdeki kollajenin %85-90'ı tip 1, %8-11'i tip 3, %2-4'ü tip 5 içerir (93). Kollajen sadece pek çok organ ve dokunun değil aynı zamanda ekstrasellüler matriksin de yapısal bir bileşeni olması nedeniyle bir çok organ, doku ve hücre patolojisinden de etkilenmektedir. Ayrıca damarların duvarlarında özellikle media tabakasında, farklı tip damarlarda oranları değişmek üzere, kollajen fibriller bulunmaktadır. Yani damarlarımız büyük ölçüde kollajen doku içermektedir. Bu nedenle pek çok organ ve doku gibi damar sistemini de etkileyebilen mikroanjyopatik komplikasyonlara neden olabilen bruselloz gibi hastalık

durumlarında yapısal bir eleman olarak kollajen proteinin yapım-yıkım ve yeniden yapım döngüsünün de etkilenmesi beklenir.

Kolajenin metabolik döngüsünde prolidaz spesifik bir enzim olduğu için önemi büyüktür (62). Kollajenin yıkımında ve prolinin kollajen yapımı döngüsüne yeniden katılımında prolidaz aktif görev almaktadır. Kollajen art arda birkaç reaksiyonla iminodipeptidlere ve bunlar da serbest aminoasitlere ayrılır. Bu aminoasitler genel sistemik aminoasit havuzuna katılmadan tekrar kollajen yapımına girer. Prolin ve hidroksprolinin her biri kollajendeki amino asitlerin % 10'unu oluşturur. Fakat hidroksprolin kollajen sentezine katılmadığından ve polipeptid zincirinin posttranslasyonel modifikasyonu sonucu prolinin hidrosillenmesiyle ortaya çıktığından dolayı kollajendeki amino asitlerin % 20 kadarını prolinin oluşturduğu kabul edilir (105). Kollajen yıkımının son basamağı prolidaz aracılığı ile olmaktadır. Prolidaz kollajen sentezi ve hücre gelişiminde rol alan prolinin dönüşümünde önemli rol almaktadır. Prolidaz beslenme ile alınan proteinlerden ve vücuttaki depo kollajeninden imino asitlerin geri kazanılmasında önemli rol oynar. Prolidaz enzimi (EC 3.4.13.9) -C ucunda protein katabolizmasında son basamakta oluşan prolin veya hidroksprolinin imino azotunu içeren peptid bağı bulunduran bileşiklerin (X-Prolin veya X-Hidroksprolin) hızlı hidrolizini katalizleyen tek enzim olduğu için spesifitesi yüksektir (89,105). Bu enzimin aktivitesinin eksikliği durumu, oldukça nadir karşılaşılan otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalığa yol açmaktadır (106).

Prolidaz eksikliği prolinin normal döngüsündeki bozulmayla sonuçlanır. Prolidaz eksikliğinde büyük miktarda prolin ve hidroksprolin üre ile dışarı atılır. İminopeptidler gibi aminoasitleri bağlar ve sonuç olarak toplam prolin eksikliği oluşur. Prolidaz enzim aktivitesi eritrosit, lökosit ve fibroblastlarda çok düşüktür. Etkilenen hasta bireylerde prolidaz enzim aktivitesi saptanamaz. İminopeptiduri aynı zamanda raşitizm, hiperparatiroidizm ve paget hastalığı gibi durumlarda tanımlanır. Fakat İminopeptidüri prolidaz eksikliğinde çok daha yüksektir. Prolidaz eksikliği cilt ve diğer kollajen dokulardaki anormallik sendromuyla sonuçlanır. Etkilenen bölümler idrara aşırı miktarda iminopeptid salgırlar ve bu peptidler prolidaz için substrat olarak görev yaparlar (89,105). Prolidaz geni başka bir kalıtsal rahatsızlık olan miyotonik distrofi ile ilgili olması açısından önemlidir. Prolidaz eksikliği kronik deri ülseri, tekrarlanan enfeksiyonlar, mental retardasyon, splenomegali, karakteristik bir yüz görünümü (örneğin zayıf saçlar yassı burun düz alın kalın dudaklar hipertelarizm) gibi çeşitli klinik bulgularla bağlantılıdır.

İlk defa 1968 yılında Goadma tarafından tanımlandı. 1974'de Powell ve arkadaşları prolidaz eksikliği olduğunu gösterdi (92).

Prolidaz enzimi ile açığa çıkan prolin ve hidroksiprolin amino asitleri, kollajen dokusunun yaklaşık % 25'ini oluşturmakta ve bağ dokusunun devamlılığının sağlanması için ise gereklidirler (107). Prolidaz enzimi; intestinal mukoza (108), böbrek (61), karaciğer (109-110), beyin (111,112), kalp (113), uterus (113), timus (114), eritrositler (115), lökositler (92,116), fibroblastlar (117) ve plazma (118,119) gibi pekçok dokuda bulunmaktadır. Geniş doku dağılımı olması prolidaz enzim aktivitesindeki değişimlerin pekçok hastalığın gelişiminde ve sonucunda önem kazanabileceğini düşündürmektedir.

Prolidaz enzim aktivitesi ölçümü yöntemi için en sık olarak Chinard tarafından tanımlanan ninhidrin tepkimesi kullanılmaktadır (120). Bu tepkime daha sonradan Myara ve ark. tarafından bazı değişiklikler yapılarak optimize edilmiştir (118). Bu yöntemde $MnCl_2$ ile 24 saat ön inkübasyon yapıp aktive edilen enzim, Gly-Pro substratı ile ($K_m = 2.9$ mM) (121) 30 dakika inkübe edilip, açığa çıkan prolin miktarı ölçülerek enzim aktivitesi hesaplanmaktadır. Bu metotda daha sonra Ömer Özcan ve ark tarafından optimize edilmiştir. Gerekçeside şu şekilde açıklanmıştır: Prolidaz enzimi aktivitesi ölçümlerinde gözden kaçan, ortamda var olan ve substratın parçalanması ile de açığa çıkan prolin amino asidinin enzimi inhibe etme riskinin varlığıdır. Çünkü prolinin prolidaz enzimini serumda fizyolojik olarak bulunduğu konsantrasyonlarda güçlü bir şekilde inhibe ettiği kanıtlanmıştır (122). Bu nedenle biz de bu çalışmamızda bu optimize metodu kullanmayı tercih ettik.

Prolidaz kollajen yapısındaki prolinin glisil ile yaptığı peptid bağınyı yıkan tek enzim olmasından dolayı prolidaz aktivitesinin kollajen turnover hızı ile direkt olarak ilişkili olmasını bekleriz (62). İyidoğan ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda serum prolidaz aktivitesinin klinik laboratuvarlarda kemik yapım ve yıkımının bir göstergesi olabileceğini tespit etmişlerdir (123). Aksoy ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada diyabetiklerde serum prolidaz aktivitesinin oldukça düşük olduğu saptanmıştır (124). Çelik ve arkadaşları siroz hastalarında serum prolidaz seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunduğu ve kollajen turnoverının insan karaciğerinde sirozun gelişimiyle değiştiğini ve prolidaz aktivitesinin bu dejeneratif karaciğer hastalığında kollajen metabolizmasının bozukluklarını yansıtabileceğini ortaya koydular (125). Söner ve arkadaşları kronik etanol ve selenyum verilen sıçanların karaciğerlerinde prolidaz I aktivitesinin kontrollere oranla artmış olarak bulmuştur (126). Arata ve arkadaşları ile

Powel ve arkadaşları prolidaz enziminin genetik eksikliğinin sonucunda mental gerilik, tekrarlayan infeksiyonlar ve deri lezyonları ile karakterize bir klinik tablonun ortaya çıktığını bildirmiştir (127). Butterworth ve arkadaşları prolidaz eksikliği olan kişilerde prolidaz I aktivitesinin deri fibroblast kültürlerinde ve kan hücrelerinde azaldığı gösterilmiştir (93).

Gürdöl ve arkadaşları ile Hui ve arkadaşları prolidaz aktivitesinin birçok dokuda ve amniotik sıvıda bulunduğunu belirlemiştir (111,128). Zuyderhoulft ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kemik hastalıklarında hiçbir zaman yüksek prolidaz değerine rastlanmadığını belirtmiştir (129). Oono ve arkadaşları kronik yara iyileşmesinde prolidaz enzim değerininin yaradan alınan sıvı örneklerinde ve blister oluşan hastalıklarda blister içi sıvı örneklerinde arttığını bildirmişlerdir (130). Yıldız ve arkadaşları kronik yaralarda uygulanan hiperbarik oksijen tedavisinde (HBO2) ise serum ve doku örneklerinde, prolidaz enzim değerleri ölçüldüğünde tedavi sonrasında, tedavi öncesine göre azalma gözlenmiştir (131). Camhson ve arkadaşları prolidaz eksikliği olan hastalarda immunodipeptidüri olduğunu göstermiştir. Chamson ve grubu prolidaz eksikliğinde en önemli değişikliğin kollajen yıkımının hızla artması olduğunu saptamışlardır. Bu olayın gerçekte bağ dokusu hastalığının değil, kollajen biosentezinin azalan prolin havuzu tarafından kısıtlanmasından kaynaklandığını düşünmektedirler (132). Myara ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda serum prolidaz aktivitesinin karaciğer sirozunda ve hasarında arttığı bildirilmiştir (86). Kronik etanol ve selenyum verilen sıçanların karaciğerlerinde prolidaz I aktivitesi kontrollere oranla artmış bulunmuştur (126). Aynı şekilde CCl₄ uygulanan sıçanların karaciğerlerinde prolidaz I aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (133). Demirbağ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sol ventriküler hipertrofidan bağımsız olarak hipertansiyon ile serum prolidaz aktivitesi arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir (134). Altındağ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada dizde osteoartriti olan hastalarda serum prolidaz aktivitesinin kontrol grubuna göre azalmış olduğu tespit edilmiştir (135). Aslan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada H.pylori(+) olgularda H.pylori(-) olgulara göre serum prolidaz aktivitesinde anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir (136).

Yaptığımız detaylı incelemeye rağmen Bruselloz hastalığında Prolidaz ile ilgili yapılmış bir çalışmaya rastlayamadık. Bütün bu bilgiler ışığında düşünülecek olduğunda prolidaz enzim aktivitesi ve bruselloz arasında anlamlı bir ilişkinin varlığı düşünülebilir. Biz de bu düşünceden yola çıkarak bruselloz ile prolidaz arasındaki ilişkiye açıklık getirmek ve brusellozun kollajen doku üzerine etkisini tespit etmek, ayrıca brusellozlu

hastalarda prolidaz aktivitesi ölçümleri ile ilgili literatürlere rastlamamış olmamızdan dolayı sonraki çalışmalara ışık tutmak istedik.

Biz çalışmayı yaparken öncelikle prolidaz enziminin ölçümü için modifiye Chinard yöntemini kullandık. Sonuç olarak çalışmada hasta grubunun değerleri ile kontrol grubu değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve hasta grubunda sonuçlar anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($P<0.01$). Bu bulgu bize brusellozun kollajen doku hasarına neden olduğunu, kollajen turnoverının (yıkım ve yeniden yapım) hızlanmış olduğunu ve bundan dolayı da brusellozda prolidaz enzim aktivitesinin arttığını göstermektedir. Serum prolidaz aktivitesinin ölçümünün kolay uygulanabilir olması ve enzim aktivitesini sağlıklı erişkinlerde büyük varyasyonlar göstermemesi prolidaz enziminin bruselloz vakalarında kollajen doku hasarının değerlendirilmesi açısından kullanılabileceği ihtimalini göstermektedir. Ayrıca hastalarda yaygın doku tutulumunun bilinmesi veya komplikasyonlarının varlığı veya yokluğuna göre gruplandırma yapılarak prolidaz aktivitesinin bu farklı gruplar arasında tespit edilerek mukayese edilmesi yakın gelecekte yapmayı planladığımız ileri bir çalışma olarak düşünülmektedir. Böylece gerek brusellozun erken kontrol altına alınması gerekse komplikasyonları hakkında önceden fikir edinilebilmesi açısından uygulanabilir bir test olarak prolidaz enzim aktivitesinin değerlendirilebileceğini ortaya koyduk.

7. KAYNAKLAR

1. Capasso L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *J Infect.* 2002; 45: 122-127.
2. Sözen TH. Bruselloz. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.* Ed: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Cilt 1, Sistemlere göre infeksiyonlar. Nobel tıp kitapçevleri. 2002; 636-642.
3. Young EJ. *Brucella species.* Mandell GL, Bennett JE, Dolin R(eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases.* 5th. Ed. Churchill, Livingstone, Philadelphia. 2000; (2) :2386-2391.
4. Chu MC, Weyant RS: *Francisella and Brucella.* Eds: Murray Patrick R. *Manuel of clinical microbiology.* 8th ed. ASM pres. Washington DC. 2003; :789-808.
5. Koneman EW, Allen DS, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn CW. *Bucella Species, In Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology.* 5th. ed, Lippincott, Philadelphia, New York. 1997; 431-436.
6. Mamıkoğlu L. Bruselloz, Önemli ve sorunlu gram-negatif bakteri infeksiyonları. Ed:Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D. *Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara.* 2005; 327-342.
7. Çelebi S. Brusellozun epidemiyolojisi. *Ankem Derg.* 2003; 17 (3): 340-343.
8. Erdenliğ S. Türkiye'de *Brucella* kökenleri. 11. *Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı.* 2003; 214-216.
9. Al Dahouk S, Tamaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis-A Review of literature. Part 1:Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clin Lab.* 2003; 49: 487-505.
10. Sümerkan B. *Brucella* Türleri. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.* Ed: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Cilt 2, Etkenlere göre infeksiyonlar. Nobel tıp kitabevleri. 2002; 1647-1652.
11. Yakupsky P, Baron EJ. Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11 (8):1180-1185.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Summary of notifiable diseases. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2003; 50: 1-108.
13. Altoparlak Ü. Brusellozun etiyolojisi. *Aknem Derg.* 2003; 17 (3): 330-332.
14. Baysal B. *Brucella.* In Ustaçelebi Ş. (eds). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.* 1.Basım. Ankara. Güneş Kitapevi. 1999; 571-577.

15. Artan C. Deneysel Fare Bruselloz Modelinde Doksisisiklin ile Levofloksasinin etkisinin karşılaştırılması. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı. Uzmanlık Tezi Kayseri.2001.
16. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 3.basım. Fakülteler Kitapevi. İzmir. 2002; 475-478
17. Yakupsky P. Minireview: Detection of brucellae in blood cultures. J Clin Microbiol. 1999; 37: 3437-3442.
18. Bilgehan H. Brucella. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları 10.baskı. Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi. İzmir. 2000; 199-214.
19. Dizer U. Brusellozis. Dahili Bilimler Ders Notları. Ankara. GATA Yayınları. 1998.
20. Lang R, Banai M, Lishner M, Rubistein E. Brucellosis: International Journal of Mikrobial Agents 1995; 5: 203-208.
21. Moreno-Lafont MC, Lopez-Santiago R, Parades-Cervantes V, Estrada-Aguilera A, Santos-Argumedo L. Activation and proliferation of the T Lymphocyte subpopulations in patients with Brucellosis. Archives of Medical research 2003; 34: 184-193.
22. Slack MPE. Gr(-) Coccobacilli, Brucella spp. In Infectious Diseases. Ed. Armstrong D, Cohen J Harcourt Publishers Ltd. London. 1999; 20 (8): 3-5.
23. Black FT. Brucellosis, In Infectious Diseases. Ed. Armstrong D, Cohen J. Volume two, Harcourt Publishers Ltd. London. 1999; 6 (34): 15-17.
24. Colmenero JD, Reguera JM, Cabrera FP, Cisneros JM. Et al. Serology, clinical manifestations and treatment of brucellosis in different age groups. Infection. 1990; 3 :152-156.
25. Gotuzzo E, Carillo C. Brucella ; In Infectious Diseases. Ed. Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklov NR. 2th ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia 1998; 1837-1845.
26. Baron EJ, Peterson LR, Finecgold SM. Genus Brucella, In Diagnostic Microbiyology. Ed. Bailey & Scott's, 9th ed. St. Louis, Missouri. 1994; 4: 408-410.
27. Mousa ARM, Saeed AM, Almudallal DS, et al. Osteoarticular complications of brucellosis: A study of 169 cases. Rev. Infect. Dis. 1987; 9 (3): 531-543.
28. Aktaş O. Brusellozda Mikrobiyolojik Tanı. Ankem Derg. 2003; 17(3): 336-339.
29. Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM. Rapid Laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton Brucella antigen DNA. J Clin Microbiol. 1996; 34: 477-478.
30. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. N Engl J Med. 2005; 352: 2325-2336.

31. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004; 4 (1): 115-123.
32. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine.* 2006; 27: 95-125.
33. Redkar R, Rosa S, Bricker B, DeVecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol Cell Probes.* 2001; 15: 43-52.
34. Fatih Köksal. Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Ed: Prof.Dr.Rıza Durmaz. Nobel Tıp Kitapevleri. 2001; 15-34.
35. Monis PT, Giglio S. Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. *Infection, genetics and evolution.* 2006; 6: 2-12.
36. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill III FR, Smith TF. Real-time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev.* Jan. 2006; 165-256.
37. Işık N, Ağaçfidan A. İnfeksiyon hastalıklarının tanısında "real-time" polimeraz zincir reaksiyonu kullanımı. *İnfeksiyon derg.* 2004; 18 (1): 125-130.
38. Bogdanovich T, Skurnick M, Lubeck PS, Ahrens P, Hoorfar J. Validated 5' Nuclease PCR Assay for Rapid Identification of the Genus *Brucella*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (5): 2261-2263.
39. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. Melitensis*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (3): 1290-1293.
40. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Garcia-Ordonez MA, Cardenas A, Colmenero JD. Development and evaluation of a PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (1): 144-148.
41. Yaylı G, Brusellozun Laboratuvar Tanısında Sorunlar. 11. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre kitabı. 2003; 211-213.
42. Al Dahouk S, Tamaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis-A Review of literature. Part 2: Serological Tests for brucellosis. *Clin Lab.* 2003; 49: 577-589.
43. Bilgehan H. Bruselloz tanısında aglütinasyon. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı.* 3. baskı. Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, İzmir. 2002; 223-227.
44. Tümtürk A, Yetkin MA, Tülek N, Kılıç D. Brusellozun tanı ve takibinde serum aglütinasyon testi ve "enzyme-linked immunosorbent assay" yönteminin yeri. *Klinik derg.* 2004; 17 (2): 107-112.

45. Garin-Bastuji B, Blasco JM, Marin C, Albert D. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. *Small Ruminant Research*. 2005; 62: 63-70.
46. Araj GF, Kaufmann AF. Determination by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G (Ig G), Ig M and Ig A to *Brucella melitensis* major outer membrane proteins and whole-cell heat-killed antigens in sera of patients with brucellosis. *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 1909-1912.
47. Sippel JE, El-Marsy NA, Farid Z. Diagnosis of human brucellosis with ELISA. *Lancet*. 1982; 2 (8288): 19-21.
48. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis*. 1992; 14 (1): 131-140.
49. Smits HL, Basahi MA, Diaz R, Marrodan T, Douglas JT, Rocha A, Veerman J, Zheludkov MM, Witte OWM, deJong J, Gussenhoven GC, Goris MGA, Vander Hooft MAWG. Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute human brucellosis. *J Clin Microbiol*. 1999; 37 (12): 4179-4182.
50. Orduna A, Almaraz A, Prodo A, Gutierrez MP, Pascual AG, Duenas A, Cuervo M, Abad R, Hernandez B, Lorenzo B, Bratos MA, Torres AR. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (11): 4000-4005.
51. Rolain JM, Maurin M, Raoult D. Bactericidal effect of antibiotics on *Bartonella* and *brucella* spp. :clinical implications. *J Antimicrob. Chemother*. 2000; 46: 811-814.
52. Yaylı G. Bruselloz. *Antimikrobiyal Tedavi Bülteni*. 1999; 3(2): 66-72.
53. Öztürk R. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinde Sorunlar: *Brucella*. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı Kitabı. İstanbul, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını. 11-12 Nisan 1997; 33: 56-64.
54. Türkçapar N, Kurt H. Bruselloz. *Güncel Bilgiler Işığında Enfeksiyon Hastalıkları*. Ed. Uzun Ö, Ünal S. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 2001; 1015-1023.
55. Cengiz AT. Brusellozda korunma ve tedavi, Prof.Dr.A. Kemal Özsan Tıp Günleri-1 Bruselloz Sempozyumu Kitabı, Ankara, 2000; 57-67.
56. Jahans KL, Fosler G, Broughton ES. The characteristics of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol*. 1997; 57: 373-382.
57. Murray PR, Rosenthal KS, Kabayashi GS et al. Eds. *Brucella*. In *Medical Microbiology*. Fourth edition, St Louise Missouri, Mosby. 2002; 312-315.
58. Milligan A, Brown G. :Prolidase Deficiency : a Case Report and Literature Review. *Brit J. Dermatol*. 1989; 121: 405-409.
59. Dolenga M., Hechtman P.: Prolidase Deficiency in Cultured Human Fibroblasts: Biochemical Pathology and Iminodipeptid Enhanced Growth. *Pediatr Res*. 1992; 32 (4): 479-482.

60. Bergmann M, Fruton J S, J Biol Chem.1937; 118: 405-415.
61. Davis NC, Smith EL: Purification and Some Properties of Prolidase of Swine Kidney, J. Biol Chem, 244:261-275, 1957
62. Boright A, Scriver CR: Prolidase Deficiency: Biochemical Classification of Alleles Am J Hum Genet. 1989; 44: 731-740.
63. Alparslan S, Gültepe M: Serum Prolidase Activity: Its Value as an Indicator of Collagen Accumulation in Chronic Liver Diseases. *Biyokimya Dergisi*. 1993; 18 (1): 1-9.
64. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara. 2002.
65. Bornstein P, Ann. REV. Biochem 1974; 43: 567-603.
66. Yaron A, Naider F. Proline-Dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem Mol. Biol.* 28:31-81
67. Crawford JL, Lipscomb WN, Schellman CG. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1973; 70: 538-543
68. Persson B, Flinta C, Von Heijne G, Jorvall E. *EUR. J. Biochem.* 1985; 152: 523-527.
69. Yüreğir G. *Temel Biyokimya I. 3. Baskı, Çukurova. Üniv. Tıp fakültesi Yayınları, Adana.* 1988; 152-153
70. Phang JM., Yeh GC. Scriver.: Disorders of Proline and Hydroxyproline Metabolism. In: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, (7th Ed) Scriver RC., Blandet al., Sly WS., (Eds) Mc Graw Hill, Montreal.* 1995; 1125-1141.
71. Scriver CR. : Disorder of proline and hydroxyproline Metabolism. In: *the metabolic Basis of Inherited Disease (4th Ed.) STANBURY, J. B. Et all.* 1978; 336-361.
72. Mock WL, Zhuang H. Chemical Modification Locates Guanidinyl and Carboxylate Groups Within The Active site of prolidase *Biochem biophys Res Com.* 1991; 180 (1): 401-406.
73. Endo F, Tanoue A.: Primary Structure and Gene Localization of Human Prolidase. *J Biol Chem.* 1989; 264: 4476-4481.
74. Endo F, Tanoue A. : Structural organization of the gene for human prolidase (Peptidase D) and Demonstration of a partial gene deletion in a patient with prolidase deficiency. *J. Biol chem.* 1989; 265 (19): 11306-11311.
75. Dannenberg AL, Garrison RJ, Kannel WB. Incidence of hypertension in the Framingham Study. *Am J Public Health* 1988; 78: 676-679.
76. Sugahara K, Ohno T.: The Use of liquid chromatography Mass spectrometry for the identification and Quantification of Urinary immunodipeptidase in prolidase deficiency. *Eur J clin-Chem Clin Biochem* 1993; 31: 317-322.

77. Myara I, Charpentier C, Lemonnier A. Optimal conditions for prolidase assay by .localization of human prolidase. *J Biol Chem*, 1989, 264 (8): 4476-4481.
78. Myara I. Effect of long preincubation on the two forms of human erythrocyte prolidase. *Clin Chim Acta*. 1987; 170 (2-3): 263–270.
79. Cheng TC, DeFrank JJ, Rastogi VK, Alteromonas prolidase for organophosphorus G-agent decontamination. *Chem Biol Interact*. 1999; 455 (62): 119-120.
80. Bielawska A., Bielawski K, Chrzanowski K, et al., Prolidase-activated prodrug for cancer chemotherapy cytotoxic activity of proline analogue of chlorambucil in breast cancer MCF-7 cells. *Farmaco*. 2000; 55 (11-12): 736-41.
81. Myara I. , Cosson C. , Moatti, N. , Lemonnier, A. : Human kidney prolidase-purification, preincubation properties and immunological reactivity. *Int. J Biochem*. 1994; 26 (2): 207-214.
82. Cesson C, Myara I. : Only prolidase I Activity is present in human plasma. *Int. J Biochem*. 1992; 24 (3): 427-432.
83. Mock WL., Green PC.:Mechanism and Inhibition of prolidase. *J Biol Chem*, 1990; 265 (32): 19606-19610.
84. Oono T , Arata J. Characteristics of prolidase and prolidase in prolidase-deficient patients with some preliminary studies of their role in Skin. *J dermatol*. 1988; 15: 212-219.
85. Radzicka A.,Wolfenden R.:Analogues of Intermediates in the Action of Pig Kidney Prolidase.*Biochemistry*. 1991; 30: 4160-4164.
86. Myara I, Myara A. : plasma prolidase activity: A Possible Index of Collagen Catabolism in Chronic Liver Disease. *Clin Chem*. 1984; 30 (2): 211-215.
87. Berardesca E, Fidell D : Blood transfusions in the therapy of case of prolidase deficiency. *Brit J Dermatol*. 1992; 126: 193-195.
88. Atara J Umemura S, Yamamoto Y, Hagiya M, Nohara N: Prolidase deficiency:its dermatological manifestations and some additional biochemical studies.*Arch Dermatol* 1979; 115: 62.
89. Endo F, Matsuda I :Human erythrocyte Prolidase and prolidase deficiency. *Pediatr Res*. 1982; 16: 227-231.
90. Tanoue A, Endo F. A Single Nucleotide Change in the Prolidase Gene in Fibroblast from Two Patients with Polypeptide Deficiency .*J, Clin Invest*. 1990; 86: 351-355.
91. Kodama H , Ohhashi T.: Characteristics and Partial Purification of Prolidase and Deficiency.Effect of Glycyl-L-Proline on the Degradation of Newly Synthesized Collagen *Clin Physiol Biochem*.1989; 7: 128-136.

92. Powell GF, Rasco MA, Maniscalco RM: A prolidase deficiency in man with iminopeptiduria. *Metabolism*. 1974; 23: 505.
93. Butterworth J, Priestman DA. Presence in human cells and tissues of two prolidases and their alteration in prolidase deficiency. *J Inher Metab Dis*. 1985; 8: 193.
94. Zanaboni G., Viglio S.: Direct Monitoring of Prolidase Activity in Cultured Skin Fibroblasts Using Capillary Electrophoresis. *J Chromatogr*. 1997; 695: 77-84.
95. Kodama H., Mikasa H.: Biochemical Investigations on Prolidase and Prolinase in Erythrocytes from Patients with Prolidase Deficiency. *Clin Chim Acta*. 1988; 173: 317-324.
96. Taşova Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, İnal S. Bruselloz: 238 erişkin olgunun klinik, laboratuvar ve tedavi özelliklerinin değerlendirilmesi. *İnfek Derg* 1998; 12: 307-312.
97. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon hastalıkları. Ankara: Nobel tıp kitapçevleri. 1996; 486-491.
98. Mandell's Principles and practice of Infectious Diseases, 5th ed, Churchill Livingstone, 2000.
99. Oksel F: Mikroorganizmalar ve lokomotor sistem. Bümüşdiş G, Doğanavşargil E (Ed): Klinik romatoloji. İstanbul. 1999; 475-487.
100. Tunç ŞE. Brusellozis. Romatizmal hastalıklar tedavi el kitabı. Karaaslan Y, Oksel F (Ed): MD yayıncılık, 2003.
101. Michelle VL. Brucellosis. In: eMedicine. Com.2001
102. Mert A, Ozaras R, Tabak F, Bilir M, et al. The sensitivity and specificity of Brucella agglutination tests. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46: 241-243.
103. Ataman Ç, Yetkin A, Tuncer G, et al. Unusual Clinical Presentations of Brucellosis. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 694-697.
104. Oono T, Yasutomi H, Ohhahi T, Kodama H, Arata J. Characterization of fibroblast-derived prolidase; the presence of two forms of prolidase. *J Dermatol. Sci*. 1990; 1: 319-324.
105. Ogata A. Tanaka T. Tomoda E. Murayama F. Endo F Kukuchi I. *Arah. Dermatol*. 1981; 117: 687-697.
106. Whang SH, Zhi QW, Sun MJ. Dual activities of human prolidase. *Toxicol In Vitro*. 2006; 20: 71-77.
107. Kurien BT, Patel NC, Porter AC, D'Souza A, Miller D, Matsumoto H, Wang H, Scofield RH. Prolidase deficiency and biochemical assays used in its diagnosis. *Anal Biochem*. 2005; 349(2): 165-175.

108. Rubino A, Pierro M, La Toretta G, Vetrella M, Di Martino D and Auricchio S. Studies on intestinal hydrolysis of peptides: II. Dipeptidase activity toward L-glutamyl-L proline and glycyl-L-proline in the small intestine of the human fetus. *Pediatr Res.* 1969; 3: 313-319.
109. Noren O, Dabelsteen E, Sjostrom H and Josefsson L. Histological localization of two dipeptidases in the pig small intestine and liver, using immunofluorescence. *Gastroenterology.* 1977; 72: 87-92.
110. Kurient BT, Porter AC, Patel NC, Kuroso S, Matsumoto H and Scofield RH: Mechanized syringe homogenization of human and animal tissues. *Assay Drug Dev Technol.* 2004; 2: 308-312.
111. Hui KS., Lajtha A: Prolidase activity in brain: Comparison with other organs. *J Neurochem.* 1978; 30: 321-327.
112. Hui KS, Weiss B, Hui M, Lajtha A. Covalent coupling of calf brain prolidase. *J Neurosci Res.* 1977; 3: 231-239.
113. Smith EL. The peptidase of skeletal, heart, and uterine muscle. *J Biol Chem.* 1948; 173: 553-569.
114. Fruten JS, Smith VA, Driscoll PE. *J Biol Chem.* 1948; 173: 457-469.
115. Adams E, Davis NC, Smith EL. Specificity of prolidase: Effect of alterations in the pyrrolidine ring of glycyl-L-proline. *J Biol Chem.* 1954; 208: 573-578.
116. Powell GF, Kurosky A, Maniscalco RM. A prolidase deficiency: Report of a second case with quantitation of the excessively excreted amino acids. *J Pediatr.* 1977; 91: 242-246.
117. Sheffield LJ, Schlesinger P, Faul K, Halpern BJ, Schier GM, Cotton RG, Hammond J, Danks Dm. Imino-peptiduria, skin ulcerations, and edema in a boy with prolidase deficiency. *J Pediatr.* 1977; 91: 578-583.
118. Myara I, Charpentier C, Lemonnier A. Optimal conditions for prolidase assay by proline colorimetric determination: Application to iminodipeptiduria. *Clin Chim Acta.* 1982; 125: 193-205
119. Endo F, Matsuda I. Screening method for prolidase deficiency. *Hum Genet.* 1981; 56: 349-351.
120. Chinard P. Photometric determination of proline and ornithine. *J Biol Chem.* 1952; 199: 61-65.
121. Ohhashi T, Ohno T, Arata J, Sugahara K, Kodama H. Characterisation of prolidase I and II from erythrocytes of a control, a patient with prolidase deficiency and her mother. *Clin Chim. Acta.* 1990; 187 (1): 1-9

122. Özcan Ö, Gültepe M, İpçioğlu OM, Bolat B, Kayadibi H: Prolidaz Mutlak Aktivitesini Değerlendirmede Fotometrik Enzim Aktivitesi Ölçüm Metodunun Optimizasyonu. Turkish J Biochem. 2007; 32 (1); 12-16.
123. İyidoğan YÖ, Gürdöl F, Öner P: Serum prolidaz I aktivitesinin kemik yapım-yıkım indeksi olarak değerlendirilmesi. İst. Tıp Fak. Mecmuası. 1999; 62: 2.
124. Aksoy N., Çelik H. Selek Ş. Güzel S. Aslan M. Elçi K. Turk J Biochem 2005; 30 (1):1-172.
125. Çelik H. Aksoy N Aslan M. Nalığül Y. Barut Ş. Turk J Biochem. 2005; 29 (1): 1-172.
126. Söner Y., Gürdöl F., Tuğrul Y., Bekpınar S: Prolidase I activity in liver tissue: effects of ethanol and selenium. Res Commun Alcohol Subs Abuse. 1995; 16: 125.
127. Arata J., Umemura S., Yamamoto Y., Hagiya M., Nohara N: Prolidase deficiency: Its dermatological manifestations and some additional biochemical studies. Arch Dermatol. 1979; 115: 62.
128. Gürdöl F., Genç S., Yalçın Ö., Gültepe M: The presence of prolidase activity in amniotic fluid and its evaluation as a maturity test. Biol Neonate. 1995; 67: 34.
129. Zuyderhoudt M.C. Brugman A. M. Smith J. J.H. Jong L.: Plasma prolidase in the rat; no index of liver fibrosis. Clinical Chemistry. 1985; 31: 4.
130. Oono T. Fujiwara Y. Yoshioka T. Arata J.: Prolidase activity in chronic wound and blister fluids. J Dermatol. 1997; 24 (10): 626-629.
131. Yıldız Ş, Ay H, Elbüken ME, Caymaz O: Hiperbarik Oksijen ile Tedavi Edilen Olgularda Prolidaz Enzim Seviyeleri. Gülhane Tıp Derg. 2004; 46 (2): 144-148.
132. Chamson A, Voigtlander V : Collagen Biosynthesis Anomalies in Prolidase Deficiency. Effect of Glycyl-L-Proline on the Degradation of Newly Synthesized Collagen. Clin Physiol Biochem. 1989; 7: 128-136.
133. Myara I, Miech G, Fabre M, Mangeot M, Lemonnier A: Changes in prolinase and prolidase activity during CCl₄ administration inducing liver cytolysis and fibrosis in rat Br J Exp Pathol. 1987; 68: 7.
134. Demirbag R, Yıldız A, Gur M, Yılmaz R, Elçi K, Aksoy N: Serum prolidase activity in patients with hypertension and its relation with left ventricular hypertrophy. Clinical Biochemistry. Accepted 29 May 2007.
135. Altındağ Ö, Erel Ö, Aksoy N, Selek Ş, Çelik H, Karaoğlanoğlu M: Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis. Rheumatology International. Published online: 10 November 2006.
136. Aslan M, Nazlıgül Y, Horoz M, Bölükbaş C, Bölükbaş F, Aksoy N, Çelik H, Erel Ö: Serum prolidase activity and oxidative status in helicobacter pylori Infection. Clinical Biochemistry. 2007; Jan; 40 (1-2): 37-40.