

T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TEMEL BİLİMLER BÖLÜM BAŞKANLIĞI  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Brucellalı Sığırlarda Serum 5'Nükleotidaz (5'NT),  
Lösinaminopeptidaz (LAP),  
γ-Glutamiltransferaz (GGT), Alaninaminotransferaz (ALT)  
ve Aspartataminotransferaz (AST) Aktivitelerinin  
Araştırılması**

**Rahşan YUCAYURT KOÇER**  
Uzman Kimyager

**Doktora Tezi**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Şaban MARAŞLI**

Kars-2008

## ÖNSÖZ

Gelişen ve değişen dünyada, insanoğlunun geçmişten beridir süregelen önemli ve değişmez konusu olan yeterli ve dengeli beslenme için yapılan sayısız bilimsel çalışmalar bu konuyla ilgili önemli derecede çözüm önerileri sunmaktadır. Beslenme söz konusu olduğunda, hayvansal ürünler; taşıdıkları biyolojik özellikleri nedeniyle, insan sağlığı için vazgeçilmez ve diğer besin maddeleriyle yer değiştiremeyecek kadar da önemli bir konumdadır.

Ülkemizde hayvancılık; artan nüfusun hayvansal protein ihtiyacının karşılanması, ihracatın artırılması, sanayi sektörüne hammadde sağlanması, ülkemizin kalkınması açılarından önemli bir potansiyele sahiptir. Büyükbaş hayvanlar arasında sığır yetiştiriciliği ülkemizde koyun yetiştiriciliğinden hemen sonra yerini almaktadır.

Beslenme alışkanlığı; coğrafik koşullar ve kültürel faktörler arasında önemli farklılıklar göstermiş olmasına rağmen; tarımsal ve hayvansal besin maddelerinin üretiminin doğru ve sağlıklı yollarla yapılması 21. yüzyılda gelişmiş ülkelerin az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelere karşı kullandığı politik, ekonomik ve stratejik bir silah olarak önemli bir konuma ulaşmıştır. Bu yüzden gelişmiş ülkelerde hayvancılık, ulusal üretimde istikrarı sağlamak amacıyla, bu konuda yapılan bilimsel çalışmaların da desteğiyle, daha akılcı ve ekonomik politikalarla desteklenmektedir.

Günümüzde, ülkelerin gelişmişlik düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan, önemli kriterlerden birisi de kişi başına tüketilen hayvansal ürün miktarıdır. Hayvansal ürünlerin kullanılması ve hayvan yetiştiriciliği hayvanlardan insanlara geçen hastalıkların riskini de arttırmaktadır. Bu yolla bulaşan Brucelloz, zoonozlar içinde önemli hastalıklardan birisidir.

Brucella genusu mikroorganizmaları tarafından oluşturulan enfeksiyöz, insan ve hayvanlarda genellikle subakut ve kronik seyirli zoonoz bir hastalıktır. İnsanlarda intermitent ateş, eklemler, genital organlar ve diğer organlarda lokalize olan yangılara yol açar. Her yıl yaklaşık yarım milyon insanda brucella vakaları görülmektedir. Irk özellikleri ve çevresel faktörlere bağımlı kalmaksızın, her ülkede, her bölgede ve her sürüde ortaya çıkabilen bu hastalık; evcil hayvanlarda önemli ekonomik kayıplara neden olmaları yanında, enfekte hayvanların et, süt ve süt ürünlerinin tüketimi yoluyla insanlara da bulaşmaları sebebiyle, insan sağlığı yönünden de önemli derecede sağlık sorunu oluşturmaktadır.

Çalışmamızda; Hastalık insidansının her sürüde farklı olması, çeşitli bulaşma olanaklarının oluşu ve özellikle latent enfekte hayvanların tespit edilmesindeki pratik zorluklar sebebiyle; brucellalı sığırlarda karaciğer enzimlerini araştırarak enfekte hayvanlardaki karaciğer hasarının enzim düzeyleriyle belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Tez çalışmamdaki değerli katkılarını, doktora eğitimim süresince desteğini ve ilgisini gördüğüm danışmanım ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Şaban MARAŞLI'ya, çalışmam sırasında numune almada bana destek olan arkadaşlarım; Dr. Adem ARANCI'ya, Arş Gör.Dr. Erhan GÖKÇE'ye ve Veteriner Hekim İneyet ASLAN'a, Mikrobiyoloji Laboratuvarında çalışmama yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Mithat ŞAHİN'e ve Arş.Gör.Özgür ÇELEBİ'ye, spektrofotometrik çalışmalarına imkan tanıyan Hayvan Besleme Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet ÖNCÜER'e, çalışmalarım için maddi ve manevi desteğini esirgemeyen eski danışman hocam Sayın Prof. Dr. Necati KAYA'ya ve bölümdeki diğer öğretim üyesi hocalarım Doç. Dr. Ayla Özcan, Yrd. Doç.Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN, Arş.Gör.Dr.Emine ATAKİŞİ, Arş.Gör.Dr. Onur ATAKİŞİ, Arş.Gör.Dr.Metin ÖĞÜN ve Arş.Gör.Oğuz MERHAN'a, çalışmam boyunca bana sabırla yardım eden sevgili eşim Hakan Ali KOÇER'e ve kız kardeşim Gaye YUCAYURT'a ve varlığını borçlu olduğum Sevgili Annem Fatma Vedia YUCAYURT ve

Sevgili Babam Yavuz YUCAYURT'a, bana umut veren ve beni yaşama bağlayan doğacak kızıma teşekkürlerimi borç bilirim.

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

---

Brucella	Br.
Alanin aminotransferaz	ALT
Aspartat aminotransferaz	AST
Gama glutamiltransferaz (gama-glutamil transpeptidaz)	GGT
Alkalen fosfataz	ALP
Laktat dehidrogenaz	LDH
5' Nükleotidaz	5'NT
Lösinaminopeptidaz	LAP
Uridin Monofosfat	UMP
Dünya Gıda ve Tarım Örgütü	FAO
Dünya Sağlık Örgütü	WHO
Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü	OIE
Sistemik Lupus Eritematozus	SLE
Ribozpirofosfokinaz	RPK
Bone Marrow Transplantation	BTM
Glikozil Fosfatil İnozitol	GPI

**İÇİNDEKİLER**

Sayfa No

---

<b>1.GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	
2.1. Brucella Abortus ( Brucellosis = Bang Hastalığı )	3
2.1.1. Epidemiyoloji	4
2.1.2. Bulaşma Yolları	6
2.1.3. Risk Faktörleri	8
2.1.4. Patojen Risk Faktörleri	10
<b>3.ENZİMLER</b>	
3.1. Klinik Biyokimyada Enzimlerin Tanımı Ve Önemi	14
3.2. 5'Nükleotidaz (5'NT)	15
3.2.1. Moleküler Karakteristiği	18
3.2.2. Fizyolojik Rolü	22
3.2.3. 5'Nükleotidaz Enziminin Klinik Önemi	23
3.3. Lösin Aminopeptidaz (LAP)	28
3.4. AMİNOTRANSFERAZLAR	32
3.4.1. Alanin Aminotransferaz (ALT)	33
3.4.2. Aspartat Aminotransferaz (AST)	35
3.5. Gama Glutamil Transferaz (GGT)	37

<b>4. MATERYAL ve METOT</b>	
4.1. Materyal	41
4.2. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler	
4.2.1. Kullanılan Cihaz ve Laboratuvar Malzemeleri	42
4.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	43
4.3. Kullanılan Metotlar	
4.3.1. ALT, AST ve GGT Ölçümü	43
4.3.2.5'NT Ölçümü	44
4.3.3.Çözeltilerin Hazırlanması	44
4.3.4. Enzim İnkübasyonu	45
4.3.5. HPLC'de Analiz	46
4.3.6. HPLC'de Elde Edilen Kromatogramlara Göre Enzim Düzeyinin Hesaplanması	49
4.3.7. Lösin Aminopeptidaz Ölçümü	50
4.3.8. Lösin Aminopeptidaz Ölçüm Sonuçlarının Hesaplanması	52
4.3.9.Standart Eğrinin Hazırlanması	52
4.3.10. Çalışmada Kullanılan İstatistik Analiz Yöntemi	53
<b>5. BULGULAR</b>	54
<b>6. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	63
<b>7. ÖZET</b>	72
<b>8. SUMMARY</b>	73
<b>9. KAYNAKLAR</b>	74
<b>10.ÖZGEÇMİŞ</b>	87

**ŞEKİLLER ve TABLOLAR DİZİNİ****Sayfa Numarası**

---

Şekil 1	Pirimidinlerin Katabolizması	17
Şekil 2	UMP ve Uridin için Elde Edilen Kromatogram	48
Şekil 3	Nükleotid Substratların Konsantrasyonlarına Karşılık İnternasyonal Ünitelerdeki ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) Nükleosid Formasyonu	49
Şekil 4	LAP Aktivitesinin Reaksiyon Mekanizması	51
Şekil 5	Sağlıklı ve Brucellalı Sığırların Serum ALT, AST, GGT, LAP ve 5'NT Aktivitelerine İlişkin Bulguların Karşılaştırılması	56
Şekil 6	AST ve ALT konsantrasyonları karşılaştırma grafiği	58
Şekil 7	GGT ve AST konsantrasyonları karşılaştırma grafiği	58
Şekil 8	GGT ve ALT konsantrasyonları karşılaştırma grafiği	59
Şekil 9	LAP ve ALT konsantrasyonları karşılaştırma grafiği	59
Şekil 10	LAP ve AST konsantrasyonları karşılaştırma grafiği	60
Şekil 11	LAP ve GGT konsantrasyonları karşılaştırma grafiği	60
Şekil 12	5'NT ve ALT konsantrasyonları karşılaştırma grafiği	61
Şekil 13	5'NT ve AST konsantrasyonları karşılaştırma grafiği	61
Şekil 14	5'NT ve GGT konsantrasyonları karşılaştırma grafiği	62



Şekil 15	5'NT ve LAP konsantrasyonları karşılaştırma grafiği	62
Tablo 1	LAP Deney Sıralaması	50
Tablo 2	Standart Çözeltinin Hazırlanması	53
Tablo 3	Sağlıklı ve Brucellalı Sığırların Enzim Aktivitelerinin İstatistiksel Değerleri	54
Tablo 4	Sağlıklı Sığırlarda Enzim Profili	55
Tablo 4	Brucellalı Sığırlarda Enzim Profili	56
Tablo 6	Enzimlerin istatistiksel önemleri ve korelasyon karşılaştırmaları	57

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Brucellozis; Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı (OIE) tarafından dünyada en yaygın zoonotik hastalık olarak bildirilmiştir. Hastalık; abortuslar, süt verimi kaybı, damızlık değeri kaybı, infertilite, veteriner hekim ve aşılama masrafları nedeniyle hayvansal üretimde büyük ekonomik kayıplara neden olurken, enfekte hayvanlarla insanların direkt teması veya kontamine olan çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketimiyle, önemli derecede halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır. Ayrıca bu durum, hayvan ve hayvan ürünlerinin ticaretine engel teşkil etmekte ve çoğunlukla kırsal kesimlerdeki küçük hayvan yetiştiriciliğinin, sosyo-ekonomik olarak gelişmesini olumsuz yönde etkilemektedir.

Hastalıklar moleküllerin, kimyasal reaksiyonların veya olayların sonucunda ortaya çıkar. İnsan ve hayvanlarda hastalıklardan sorumlu çeşitli faktörler mevcuttur. Mekanik travmalar, fiziksel etkenler, belli bazı toksik bileşikler, tedavide kullanılan ilaçlar ile bakteriler, virüsler, parazitler, mantarlar gibi biyolojik etmenler, oksijen yetersizliği, genetik bozukluklar, immünolojik reaksiyonlar, besinsel ve hormonal dengesizlikler, hücre veyavücutta çeşitli biyokimyasal dengesizlikler hücrede biyokimyasal mekanizmaları tetikleyerek etkilerler.

Biyokimyasal reaksiyonların hızlarını kontrol eden enzimler, ara metabolizmada aktif bir rol oynarlar. Dokulardaki hücrelerden enzimler kan dolaşımına geçerler ve belirli bir konsantrasyonda bulunurlar. Çoğu enzimler hayat olaylarını düzenlediklerinden, bunların aktivitelerindeki artış veya

azalışlar, normal fonksiyonların bozulmasına ve hastalıklara neden olmaktadır.

Kanda, düşük konsantrasyonda olmak üzere çok sayıda enzim bulunur. Bunlardan; aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), gamaglutamiltransferaz (GGT), alkaleen fosfataz (ALP) gibi bazı enzimlerin kanda değişik konsantrasyonlarda bulunması genellikle doku ve organlardaki çeşitli patolojik değişikliklerin göstergesi sayılır.

Klinik biyokimyada önem kazanan serum enzim düzeyleri ve diğer kan parametrelerinin saptanması klinisyenlere tanı açısından önemli destek sağlar. Sığırlarda yaş, cinsiyet, ırk ve birçok hastalığa göre transaminazlar ve Alkaleen fosfataz (ALP), Laktat dehidrogenaz (LDH) gibi birçok enzim değişikliği 25–30 yıldır bilinmektedir.

Biz de bu çalışmada; brucellalı sığırların serumlarında AST, ALT, GGT, 5'NT ve LAP değerlerinin düzeylerinde değişiklik olup olmadığını saptamak ve brucellanın sığır karaciğerine verdiği hasarı bu enzimlerin yardımıyla ortaya koyarak, sığırlarda bu değerlerle ilgili verdiğimiz bilgi ile bundan sonra yapılan araştırmalara yardımcı olmayı amaçladık.

## 2.GENEL BİLGİLER

Brusellozis, hem insan hem de hayvan sağlığını yakından ilgilendiren ve hayvansal üretim kayıplarına neden olan bulaşıcı, akut, subakut veya kronik seyirli zoonoz bir enfeksiyondur (108). Brusellosis etkenleri: Sığırlarda (Br. abortus), keçilerde (Br. melitensis), domuzlarda (Br.suis) ve koyunlarda ise (Br.ovis)'dir (46, 60, 108,123). Genelde temel belirtileri dişilerde abort veya ölü doğum, erkeklerde çoğunlukla kısırlıkla seyreden orchitis, epididymitis gibi üreme sorunlarıdır. Meme ve üreme organında ortaya çıkar ve kronik oluşu bu hastalığın karakteristik bir özelliğidir (87). İnsanlarda hastalık riski ve büyük ekonomik etkilerinden dolayı, birçok ülke hastalığı iç hayvan popülasyonlarında yok etmeye uğraşmıştır. Kontrol programlarında başlıca iki metot kullanmıştır: Genç veya yetişkin hayvanların aşılması ve serolojik teste verdiği reaksiyona göre enfekte hayvanların kesilmesidir (90,98).

### 2.1. BRUCELLA ABORTUS ( BRUCELLOSIS = BANG HASTALIĞI )

Br. abortus enfeksiyonu ile ortaya çıkan bu sığır hastalığının karakteristik özelliği, gebeliğin ileri dönemlerinde düşük ve sonradan dişilerde yüksek oranda infertilite, erkeklerde değişen derecelerde kısırlıktır (108).

Br. Abortus'un birçok biyotipi vardır (111,124). En az 9 biyotip, birçok varyant ile tanımlanır. Enfeksiyonların yaklaşık %85 'i biyotip 1'dir. Biyotip 2, Kanada da 1986 da çıkan bir brucellosis salgınında izole edilmiştir (88). Biyotipler 1–4, Amerika da bulunmaktadır (46).

### 2.1.1. Epidemiyoloji

Çok geniş yayılım alanı olan Brusellosis dünyanın birçok ülkesinde özellikle mandıra hayvanları arasında büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Görülme oranı sürüler, bölgeler ve ülkeler arasında önemli ölçüde değişir. Bu nedenle etkilenen hayvanların yüzde olarak oranlarının çok fazla bir önemi bulunmamaktadır. 1986'da 175 ülkenin 120'sinde sığırlarda brusellosis bildirilmiştir (122). Birçok ülke hastalığın kökünü kurutmada (eradikasyon) önemli ilerlemeler kaydederken Afrika ülkelerinde hala brusellosis, veterinerlik mesleğinin karşılaştığı en ciddi hastalıklardan biri olarak belirtilmektedir (108).

Türkiye genelinde 1991 yılında yapılan sero-survey çalışmasında, sığır bruselloz'unun seroprevalansı % 1,01 olarak tesbit edilmiştir (65). Kars yöresinde, 1962–1969 yılları arasında rakam % 7 iken, 1993 yılında yapılan sero-survey çalışmasında ise % 6,49 oranında brucelloz prevalansı saptanmıştır (9, 65). Şeyda ve ark. (127) % 74,6 bulurken, Güllüce ve Leloğlu (51), Kars merkez ve ilçelerine bağlı yerleşim birimlerinde yaptıkları çalışmada, % 53,89 gibi yüksek derecede seropozitiflik bulmuşlardır.

Enfeksiyon her yaştaki sığırdaki görülür ama ergenliğe gelmiş hayvanlarda çok daha yaygın biçimde devam eder. Kongenital enfeksiyon, enfekte anneden doğan buzağılarda görülebilir. Enfeksiyon uterusda bulunur ve dananın erken yaşlarında gizli kalabilir, hayvanın enfeksiyonu yaymaya başlayabileceği dönemden ilk doğumuna kadar serolojik olarak negatif olabilir.

Taşıyıcı anneden doğan danalar, kolostral antikorlar nedeniyle genellikle 4–6 aya kadar serolojik olarak pozitifdir. Fakat enfeksiyon bazı danalarda varlığını gizli olarak sürdürür ve genellikle daha sonra yapılan testlerde serolojik olarak negatif sonuç verdiği kaydedilmiştir (85,124). Gizli

enfeksiyonların sıklığı bilinmemesine karşın, oranın %2,5–9 arasında olduğu bildirilmiştir. Serolojik olarak negatif olan hayvanlardaki bu gizli enfeksiyonlar belirti vermeden kaldığı için daha sonra potansiyel bir enfeksiyon kaynağı olarak hastalığı yayarlar (108).

Yapılan bir çalışmada 135 tane enfeksiyon geçirdikten sonraki ilk gebelikleri olan ineklerden ve enfekte ineklerden doğmuş 150 dananın hiçbirinde bakterinin izole edilmediği rapor edilmiştir (85). Başka bir çalışmada ise, geniş bir alana yayılmış Br. abortus biyotip 2 ile enfekte olmuş düvelerden biri, enfeksiyonsuz başka bir sürüye katıldıktan 9 yıl sonra, sütünden aynı biyotip izole edilip, serolojik testte güçlü pozitif reaksiyon verinceye kadar, hayvanın hastalık belirtilerini göstermediği tespit edilmiş ve bunun sonucunda seropozitif annelerden doğan danaların, damızlık olarak kullanılmaması gerektiği kanaatine varılmıştır (28). Seropozitif annelerden doğan düvelerin aşılı olmasının da gizli enfeksiyon taşımalarını önleyemediği ileri sürülmektedir (108). Seropozitif annelerden doğan düvelerin % 2,52'sinin ergenlik döneminde reaksiyon gösterme ve sürü için tehlike oluşturma riskleri bulunduğu rapor edilmektedir (34). Aşılı enfekte veya enfekte olmayan anneden, kolostrum almış danalarda, Br. abortusun meydana getirdiği kolostral antikora ait yarılanma ömrünün 22 gün olduğu bildirilmektedir (35, 65).

Doğal yollarla enfekte olan domuzlarda bakteri izolasyonu yapılabilmektedir domuzlarda enfeksiyon patojenik etkili olmamasına rağmen nadirde olsa düşüklere sebep olmaktadır. Bu hastalık enfekte sığırlarla bir arada barındırılan ve temas halinde olan koyunlara da geçmektedir. Bu yolla koyunlara bulaşmanın engellenmesi yani koyunlarla sığırların ayrı barınaklarda tutulması hastalığın eradikasyonunda özel bir önem arz etmektedir (108).

Bizon, geyik (27), karaca, kır kurdu (36), yabani opossum, rakun (126), Amerikan geyiği (62) diğer yabani ve evcil geviş getiren hayvanlarda (28, 37) enfeksiyon varlığı kaydedilmiştir.

Amerika Birleşik Devletlerinde bulunan bizon ve geyiklerin son yıllarda potansiyel bruselloz taşıyıcıları olduğu ve büyükbaş hayvanlar için enfeksiyon kaynağı oluşturdukları kaydedilmiştir (121). Sığır brucellasının Kuzey Amerika'da etkin olarak yok edilmiş olmasına rağmen, enfekte olmuş bizon ve geyiklerin varlığının bu bölgede çiftlik hayvanı üreticilerine ciddi bir tehdit oluşturacak kadar fazla coğrafik dağılıma sahip olduğu bildirilmektedir (108).

Çiftlik köpekleri genellikle önemli bir Br. abortus kaynağı olarak düşünülmeler de, brusellozis için serolojik olarak pozitif çok sayıda büyükbaş hayvan bulunan çiftliklerde, köpeklerde de bakteri izolasyonunun yapıldığı kaydedilmiştir (88).

Atlarda 8 yılı aşkın bir süre yürütülen serolojik incelemeler sonucu serum örneklerinin %8–16'sının pozitif olduğu belirtilmiştir. Buna rağmen deneysel olarak enfekte edilen atların, yakın temasta oldukları büyükbaş hayvanlara enfeksiyonu bulaştıracak kadar mikroorganizmayı dışkı, sidik veya ter yoluyla dışarı atmadığı ileri sürülmektedir (37,91).

### **2.1.2. Bulaşma Yolları**

Enfekte büyükbaş hayvanların doğurmasını takiben kolay etkilenen hayvanların maruz kaldıkları risk üç faktöre bağlıdır:

- 1- Dışkı, sidik vs. ile atılmış mikroorganizma sayısı
- 2- Bu mikroorganizmanın belirli çevre koşulları altında hayatta kalması
- 3- Yeterli sayıda mikroorganizmaya maruz kalmış hayvanların enfeksiyon oluşturma olasılığıdır.

Brusella abortus bakterisinin en yüksek konsantrasyonda bulunduğu yerler gebe hayvanın uterusu, fetus ve fetal membranlardır. Bu dokuların en önemli enfeksiyon kaynağı olduğu bildirilmektedir (94).

Deneysel vakalara dayanarak, peş peşe yapılan doğumlarda, uterus atıklarıyla mikroorganizmanın gittikçe azaldığı belirtilmiş hatta bu ineklerin uteruslarında ikinci ve üçüncü doğumlardan sonra enfeksiyonun bulunmadığı bildirilmiştir (108).

Hastalığın bulaşma yolları genel olarak, ağız yoluyla beslenme, deriden veya gözden penetrasyon ve sağım esnasında meme ile temasdır. Mikroorganizmanın dışarıda çoğalamadığı ve vücut dışında canlı kalabilmesinin çevre şartlarına bağlı olduğu genel kabul görmektedir (54, 58, 86). Enfeksiyonla bulaşmış çayırlarda otlama, enfekte ineklerin fetal atıklarıyla kirlenmiş su ve yemlerin tüketilmesi, yeni doğmuş enfekte danalar veya abort materyalleri ile temas en çok rastlanan yayılma yollarıdır. Metritis sebebiyle kongenital enfeksiyon oluşabilmekle beraber bu duruma nadir olarak rastlanmaktadır. Yatay bulaşma direkt olarak kirlenme ile meydana gelmektedir. Enfeksiyonun sinek, köpek, fare, kene, enfekte bot, hayvan yemleri ve diğer cansız nesnelere ile bulaşma olasılığı var ise de önlem alındığı takdirde çok önemli sorun olmamaktadır (54, 108).

Uterin atıklarıyla kirlenmiş bir inek kuyruğu diğer hayvanların göz ve açık deri ile teması halinde enfeksiyon yayabilir. Benzer şekilde birçok mastitis formu da sağım esnasında yayılabilir. Br. abortus enfeksiyonu, süt verimi döneminde süte de geçer. Bu şekilde enfeksiyonun yayılmasına sebep olur. Ayrıca insanların da bu sütü tüketmesi sebebiyle bu yolla insanlarda da hastalık oluşabilir (77, 108).



### 2.1.3.Risk Faktörleri

Sığırlarda Brusella'nın bulaşması, yayılması, bakım ve kontrolünü etkilediği düşünülen değişkenler, hayvan sayısı, idaresi veya hastalığın biyolojisi ile ilgili olarak sınıflandırılır (114). Seropozitif hayvanlara önemli ölçüde etkisi olan değişkenler şunlardır: çiftliğin büyüklüğü, suni olarak döllenmiş hayvanların çiftlikteki yüzdesi, çiftlik hayvanlarına yapılan yatırımın yüzdesi, bir önceki yıl düşük yapmış ineklerin sayısı, çiftlikteki ana tarımsal faaliyetin sütçülük olup olmadığı ve taşıyıcı hayvanların elden çıkarılması konusunda çiftlik sahibinin tutumu. Enfekte hayvanların sürünün geri kalanıyla temas süresi arttıkça, seropozitif hayvanların sayısında da artış olur. Brucella kontrol programının uygulanmadığı Kuzey Meksika'da belirli bir bölgedeki seropozitif hayvanların büyük bir yüzdesi, zayıf suni döllenme tekniklerinin uygulandığı ve düşük mali yatırımların yapıldığı çiftliklerde bulunmaktadır (114,122).

Belirli bir coğrafyada brusellanın yayılmasını etkileyen faktörler iki temel kategoride sınıflandırılabilir: sürüler arasında hastalığın yayılması ile ilgili olanlar ve sürü içinde enfeksiyonun korunması ve yayılması ile ilgili olanlar (38). Hastalığın sürü içi yayılmasını etkileyen faktörler arasında enfekte olmuş hayvanların satın alınma sıklığı, satın alınan yer ve brusella test geçmişi de vardır. Enfekte sürülerin temiz sürülere yaklaşması önemli bir risk faktörüdür. Hayvanların sınır çitlerine teması, aynı otlak veya çayırlarda otlaması ve kayıp, başıboş gezen enfekte hayvanların temiz sürülere karışması hastalığın komşu sürülere yayılmasında yaygın sebeplerdir.

Aşılanmamış hayvanların bulunduğu enfekte sürülerde hastalığın yayılması ile ilgili risk faktörleri, sürünün büyüklüğü, nüfus yoğunluğu, barınma şekli ve gebelik ağıllarının (hayvanların kontrol için sıkıştırıldığı küçük yer) kullanılmasıdır. Sürü büyüklüğünü korumak için dışarıdan enfekte

hayvanların satın alınması yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Hastalığın yayılmasına yol açabilecek yanlışlar sebebiyle büyük sürülerin idare edilmesi çok zordur. Gebelik ağıllarının kullanılması ile hastalığın yaygınlığının azalması arasındaki ilişki, muhtemelen enfekte hayvanlarla diğerleri arasında azalan temas yüzündendir.

Büyükbaş hayvanların Br. abortus'a hassasiyeti yaş, cinsiyet ve her bir hayvanın üreme durumuyla ilgilidir. Gebe hayvanlar, gebe olmayan veya seksüel bakımdan yetişkin olmayan hayvanlara nazaran hastalık enfeksiyonuna karşı daha hassastır (108). Hastalığa doğal yolla maruz kalma daha çok doğum esnasında ortaya çıkar. Düşük yapan veya yavrulayan enfekte ineklerin sayısı arttıkça, sürüdeki diğer hayvanların maruz kalma riski artar. Bu gözlemin önemli bir uygulaması, enfekte hayvanların doğumdan önce sürüden ayrılmasıdır (34). Hastalığın yayılması açısından tüm sürünün aşılmasını takiben, doğum sonrası enfekte olmuş ineklerin sürüden ayrılmasından ziyade, gebelik dönemi ve doğum, olaylarının sürü içinde planlanmasının yapılması daha önemlidir. Genç sığırlar, yaşlı ve ergenliğe ulaşmış sığırlara nazaran Br. abortus'a daha az hassastır. Genç ve ergen olmayan sığırlar genellikle enfekte olmaz veya çok hızlı iyileşirler. Hastalık riski, gebelik ile artar ve gebelik ilerledikçe hassasiyetin de artmasına neden olur (108).

Hastalığın bir sürüden diğerine veya bir alandan diğerine yayılması genellikle, enfekte bir sürüdeki bir hayvanın enfekte olmamış ve kolay etkilenen bir sürüye hareketi ile olmaktadır. Enfekte sürülerdeki veya alanlardaki sığırların, enfekte olmamış, temiz sürü veya alanlara düzensiz hareketi, brucellosis hastalığının yok edilmesi için uygulanan programların çökmesindeki ana sebeptir (108). Kanada'da yapılan bir vaka kontrol çalışmasında enfekte sürülere yakın konumlandırılmış veya sahiplerinin çok sık hayvan alımı yaptığı sürülerin brusellozis kapma riskinin daha fazla olduğu sürünün enfeksiyona yakalanması durumunda temizlenmesi için

gereken zamanın sürü büyüklüğü, abort sayısı ve serbest barınma koşullarının varlığı ile bağlantılı olduğu bildirilmektedir (76).

#### 2.1.4.Patojen Risk Faktörleri

Br. abortus, host fagositler içinde çoğalma ve hayatta kalma kapasitesine sahip fakültatif intrasellüler bir bakteridir. Mikroorganizmalar polimorfonükleer lökositler tarafından fagosit edilir; fagosit edilmeyen bir kısmı yine de bazıları hayatta kalır ve çoğalarak lenfosit dokulara ve fetal plasentaya geçer (87). Lökositler enfeksiyonun ilk ürediği yerde etkili olarak bakteriyi yok edemezlerse lenf düğümlerine, retiküloendotelial sistem gibi bölgelere ve uterus, meme gibi organlara yayılır (60). Fagolizozom olarak yaşama yeteneğine sahip olduğu için bakteri makrofajlar içinde de canlı kalabilir. Brusella lökositler içinde de yaşayabilir ve kan yoluyla yayılma esnasında vücut sıvıları (humoral) ve hücre sel bakteri öldürücü mekanizmalardan korunmak için nötrofil ve makrofajların her ikisinden de faydalanabilir (108). Plasenta mikroorganizmanın çoğalması için ideal yerdir.

Bağışıklık mekanizması doğal yollardan enfekte olmuş ve strain-19 ile aşılansmış genç hayvanlar, serum ve diğer aglütinasyon testlerini uzun süre pozitif verirler. Br.abortus ile enfekte sığırların serumunda yüksek miktarlarda IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> ve IgA antikor izotipleri vardır (94). 4 ila 8 aylıkken aşılans hayvanların çoğu bir yıl içerisinde testte negatif duruma dönerler. Tümünün enfeksiyona karşı göreceli bir bağışıklığının olduğu düşünülür. Testte pozitif taşıyıcı olan ineklerin danaları kolostrum yoluyla pasif bağışıklığa sahiptir. Bazı danaların aşılama ile çakışacak kadar bağışık kalmaları mümkündür. Sığırların strain-19 ile aşılansmasını müteakip, yaklaşık 5 gün sonra IgM antikorları ortaya çıkar ve 13 gün sonra pik değerlere ulaşır. IgG<sub>1</sub> antikorları kısa bir süre sonra veya IgM ile eşzamanlı olarak ortaya çıkar ve pik

değerlere 28–42 günlerde ulaşılır. Aynı genel görüntü, öldürücü strainlerle deneysel enfeksiyonlarda ve ayrıca IgM antikorunun düşük seviyelere düştüğü, geriye IgG1 ve IgG2 aktivitesi ile yüksek seyreden IgA aktivitesinin kaldığı durum hariç diğer kronik vakalarda izlenir (34, 108).

Bu hastalıktan dolayı hayvan üretimindeki kayıplar, özellikle de düşük yapan ineklerin azalan süt üretiminden dolayı ekonomik olarak çok önemlidir. Kısırlığın sonucu olarak süt salgılama periyotları artar ve enfekte bir sürüde ortalama danalama periyodu aylarca uzayabilir. Süt üretimindeki kayıplara ilaveten dana kaybı ve yetiştirme programında engeller oluşur. Bu dana yetiştiriciliğinin tek gelir kaynağı olduğu sığır çiftliklerinde çok önemlidir. Geçici ve sürekli kısırlığın yüksek oranda tekrarlaması değerli ineklerin yoğun bir şekilde ayıklanması ile sonuçlanır ve plasenta tutulmasını takiben akut metritis sebebiyle bazı ölümler meydana gelir.

Zoonotik implikasyonlar açısından hastalık insan sağlığı için önemlidir, çünkü insanlarda artıp, azalan tarzda bir ateşe sebep olabilir. Enfekte sütün içilmesi ile enfeksiyon bulaşma olasılığı, sütlerin pastörizasyonunu gerekli kılar. Resmi olarak kabul edilmiş ticari pastörizasyon metotları Brucella bulaşmış sütleri tüketim için güvenli hale getirir (108). Bununla birlikte, insanlardaki birçok vaka mesleki maruziyetten kaynaklanır ve çiftçiler, veterinerler ve kasaplarda ortaya çıkmaktadır. Mikroorganizma meme ve uterusdan başka birçok organda izole edilebilir ve enfekte hayvan leşine temas yüksek oranda bulaşma sebebidir. Hastalığın insanlara da bulaşması onun kökünü kazımadaki en önemli gerekçelerden birisidir. 1965–1974 yılları arasında Birleşik Devletler de, insanlarda brusellosis görülme sıklığı artmıştır (111). Birçok vaka et işleme endüstrisinde çalışan insanlarda ortaya çıkarken, diğer bulaşma kaynakları evcil domuz, sığır ve pastörize edilmemiş günlük süt ürünleridir. Texas'da, insanlarda ortaya çıkan brusellosis vakalarının büyük bir kısmı pastörize edilmemiş keçi sütünden yapılan peynirlerin ithalinin yasaklanması ile önlenmiştir (67). 1964 –1974 yılları arasında Birleşik Devletler'de bildirilen brusellosis vakalarının %1,7'si laboratuvarlarda insanlar tarafından kapılmıştır. Br. abortus strain 19 ' un yol

açtığı laboratuvar kaynaklı menenjit vakalarından biri, veterinerler için aşı üretimi sürecinde çalışan bir işçide rastlanmıştır (108).

*Brucella abortus* lenf düğümleri, eklemler ve keselere, dişi mikroorganizmada uterus ve memeye, erkek hayvanlarda ise erbezleri ve diğer erkek cinsiyet bezlerine karşı özel bir ilgi duyar. Vücuda girdikten sonra, ilk olarak lenf düğümlerine yerleşir. Daha sonra dalak ve memeler gibi organlara yayılır. Yeni doğan danalarda uterustaki enfeksiyonun sonucu olarak konjenital enfeksiyon görülebilir ve enfeksiyon serolojik olarak negatif danaların az bir kısmında, ilk doğum veya düşük sonrasına kadar sürüp gidebilir (85). Hiç doğum yapmamış ve gebe olmayan sığırlar enfekte olabilirler ama vücut sıvılarında bulunan antikoları gebe iken enfekte olmuş sığırlara nazaran çok daha hızlı kaybederler. Genç ve gebe olmayan ineklerde, bakterinin yerleşmesi memede başlar ve hayvan gebe kalırsa, memeden yayılan bakterilerle uterus da enfekte olur. Enfekte olmuş memeler klinik olarak normal olmakla birlikte süt içen insan ve danalar için enfeksiyon kaynağı olduklarından ve süt agglütinasyon testlerine temel olmalarından dolayı önemlidir. *Br. abortus*'un çoğalmasında uyarıcı etkisi olan ve fetus tarafından üretilen bir madde olan Eritritol, fetal ve plasental sıvılarda en yüksek konsantrasyona ulaşır ve muhtemelen de enfeksiyonun bu dokularda yerleşmesinden sorumludur. Enfeksiyonun gebe uterusu ele geçirmesinden sonra ilk lezyonlar uterus çeperlerinde ortaya çıkar ve hemen sonra uterus kanalına (lumen) yayılarak interkotiledonar bölgelerde ciddi ülserik endometritise sebep olur. Enfeksiyon daha sonra allantokoryon, fetal sıvılar ve plasental kotiledona yayılır, villi hasar görür. Bakteri geniş getiren plasentaya karşı özel bir ilgi duyar. Gebe ineklerin akut enfeksiyonunda, bakterinin %85 'i kotiledonlar, plasental membran ve allantoik sıvıdadır (67).

Keçiler, sığırlara ait patojenik *Br. abortus* tipine (strain) karşı hassastırlar ve sığır brusellosisi üzerine yapılan çalışmalar için uygun bir modeldir (5). Bakterinin, damar içi veya uterus arterlerinden verilen gebe keçilerde, enjeksiyon sonrası 5 gün içerisinde plasentitis oluşur ve 11 gün içerisinde de düşük meydana gelir. Mikroorganizmanın bitişikteki

korioallantoik trofoblastlara yayılması ile plasentomal eritrofagositiğin enfeksiyonu, akut brucellosis de görülen pertiplasental plasentitisi açıklamaktadır (87).

Doğal veya deneysel yoldan Br. abortus ile enfekte olmuş fetüslerde, çoklu (multiple) lenf düğümlerinde lenfoid hiperplazisi, timus korteksinde lenfoid çöküş, adrenal kortikal hiperplaziya gibi doku değişiklikleri olur (58, 108).

### 3.ENZİMLER

#### 3.1. KLİNİK BİYOKİMYADA ENZİMLERİN TANIMI ve ÖNEMİ

Enzimler, biyolojik tepkimeleri hızlandıran organik maddelerdir. Galaktozemi, miyokard enfarktüsü, kemik hastalıkları, prostat kanseri, tıkanma sarılığı ve muskuler distrofi gibi birçok hastalık enzimlerin analizi ile teşhis edilmektedir. Enzim aktiviteleri bazı hastalıklarda yüksek, bazılarında düşük bazılarında da hiç olmayabilir (42,96). Tanısal açıdan önemli olan enzimlerin çoğu sentezlendikleri hücre içinde aktiftirler. Ayrıca molekül kütleleri de fazla olduğundan dolayı hücre zarından kolayca geçemezler. Bu nedenle hücre içi enzimleri çok az miktarda kana veya diğer vücut sıvılarına geçerler (71, 73, 84).

Dolaşımdaki bir enzimin aktivitesi dokulardan salınımına, inhibitörlerin varlığına ve kandan uzaklaştırılma hızları arasındaki dengeye bağlıdır (84).

Enzimler, klinik laboratuvar analizlerinin, oldukça önemli bir kısmını teşkil eder ve çok geniş bir hastalık grubunun tanısında ve tedavilerinin takibinde, bu enzimlerin plazma aktiviteleri çok değerlidir. Plazma enzim aktivite düzeyleri, hastalıkların tanısında, ayırıcı tanısında ve tedavinin takibinde kullanılır. Özellikle ayırıcı tanıda, enzimlerin veya izoenzimlerin dokulara göre spesiflik göstermesi önem taşımaktadır. Bu bakımdan plazma enzimlerinin doku kaynaklarını ve hücredeki lokalizasyonlarını bilmek doğru yorumlama açısından son derece önemlidir (11).

### 3.2. 5'NÜKLEOTİDAZ (5'NT)

Bu enzim hakkında 1934 yılında Reis J. tarafından kas dokusunda nötral pH'da ribonükleozidleri ve inorganik fosfatları çökererek ribonükleozid–5'–monofosfatları (adenozin 5'–fosfat, inozin 5'–fosfat) hidrolize eden bir enzim aktivitesinden bahsedilmiştir. Reis'in bahsettiği bu enzim eski adıyla "5'ribonucleotide phosphohydrolase" şimdiki adıyla "5'nucleotidase"dır (5'NT). 5'NT öncelikle karaciğerde kanalikulus ve sinüzoidal mambranda yerleşmiş olup, ayrıca barsak, beyin, kalp, kan damarları, pankreas, böbrek interstisyumunda, fibroblastlarda, eritrositlerde ve lökositlerde bulunan hepatobilyer, hematolojik, immünolojik ve neoplastik hastalıklarda önemi olan bir enzimdir. 5'NT hakkındaki ilk geniş çaptaki yayınlar 1970'li yıllarda görülmektedir. İlk yayınların amacı enzimin özelliklerini, dağılımını, fonksiyonları analitik biyokimyasal yapısı hakkında bilgi vermektir. Sonra vücut sıvıları, hücre ve dokularda 5'NT aktivitesinin ölçümünün klinik anlamı, önemi araştırıldı. 5'NT daha çok hücre membranında yer almakla beraber daha az olarak da mitokondri ve mikrozoamlarda bulunmaktadır. 68.000 ve 70.000 dalton ağırlığında iki subüniti vardır. Optimal etkisi 6,5–8,4 pH'da olur (2).

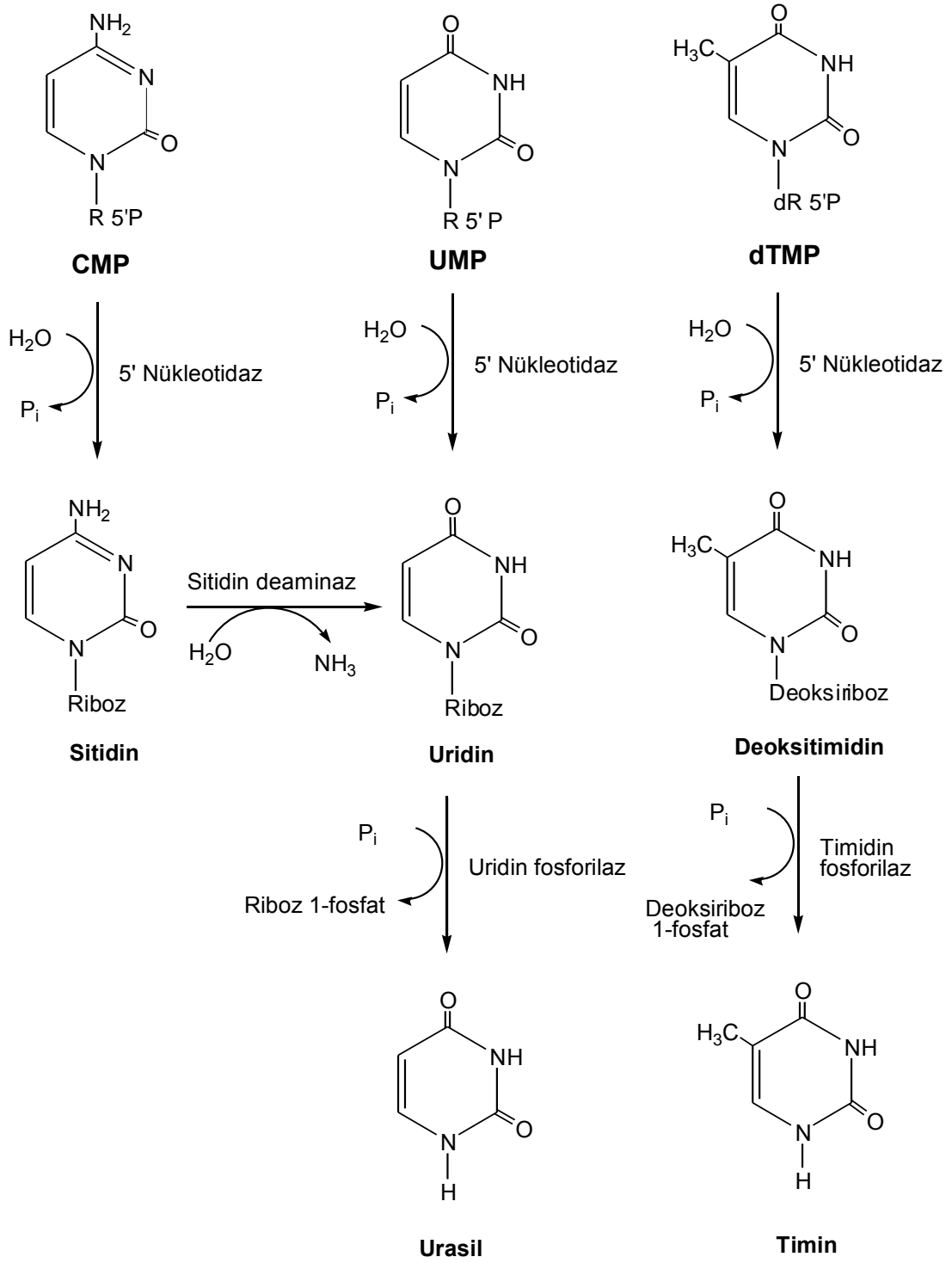
5' Nükleotidazlar, nükleotid moleküllerinin riboz ve deoksiriboz kısımlarının 5' karbonunda esterleşmiş fosfat grubunun hidrolizini katalizleyen bir enzimdir (2,141). Nükleotidler nükleik asitleri meydana getiren büyük kısmıdır ve büyük enerji kaynağıdır. Nükleozidler döngüde, azotlu baz ve riboz–1–P veyadeoksiriboz–1–P vermek üzere nükleosid fosforilazlar ile hidrolize olurlar. Sonrasında R–1–P ve R–5–P dengededir, şeker fosfatı



nükleotidlerle her zaman birleşebilirler veya heksosmonofosfat yolunda metabolize olurlar (45).

Nükleotidazın aktivitesi, memeli dokularından çıkarılan parçaların asit ve alkalın fosfatlarının tanımına uymasıyla keşfedilmiş ve pürin ile pirimidin üzerinde aktifliğinin eşit olduğu bulunmuştur (118).

Pirimidin veya uridin mono fosfat hidrolaz (UMPH) pirimidin salvage siklusunun ve nükleotid monofosfatların spesifik hidrolizini katalizleyen ilk degradatif enzimdir (45). Asit fosfatazlar tek bir spesiviteye sahiptirler ve pirimidin 5'ribozilmonofosfatların defosforilasyonuna hidrolitik etki göstermektedir (109).



Şekil 1: Pirimidinlerin Katabolizması (29).

### 3.2.1. Moleküler Karakteristiği

5'NT hepatic dokuda iki tür olarak saflaştırılmıştır. Mikrozoamlarda ve plazma membranında lipoproteinler gibi lokalize olmuşlardır. Mikrozomal 5'NT'nin yüksek aktivitesi 5'AMP, 5'CMP ve 5'UMP'ye düşük aktivitesi ise 5'IMP ve 5'GMP' de görülür (57, 59, 134, 136,138).

5'NT'nin ilk tanımı eksik olarak Valentine ve ark. (133) tarafından 1974 yılında yapıldıktan sonra bu enzim normal insan homojenizatından saflaştırılmış ve moleköl karakteristikleri tayin edilmiştir.

Proteinin tersiyer yapısı bilinmemektedir; fakat 64969.8Da moleköl ağırlığında, 561 aminoasit dizininden gelen tahminlere göre 5'NT %30  $\alpha$  helezonlu ve %26 genişletilmiş iplikli küresel bir proteindir (4). 5' NT'nin 3D formu ise "4-layer sandwich" yapısındadır (139,141).

İlk deneyler enzim kinetiğini tanımlamaya yönlendirilmiştir ve tercih edilen doğru substrat hakkında yanıtıcı sonuçlar üretilmiştir. Çalışmalar göstermiştir ki P5'N-1 eksikliği olan bireylerden alınan eritrositler UMP, CMP, TMP ve dCMP'ye karşı aktivitesinin eksikliğine rağmen dUMP ve dTMP'yi normal olarak hidroliz edebilir. Bu hipoteze göre; pirimidine nükleotidaz aktivitesi ile normalde iki izozim bulunmaktadır ve bunlara P5'N-1 (UMPH-1) ve P5'N-2 (UMPH-2) adları verilmiştir (104,125). Sadece UMPH-1 yetişkin eritrositlerdeki nükleotidlerin hidrolizi için önemlidir. Her iki enzim de insan doku homojenizatındaki eritrositlerden saflaştırılmışlar ve kısmen karakterize edilmişlerdir. Kendi aralarında substrat spesifitesiyle ayırt edilmişlerdir. Sıcaklık ve pH'ya bağımlı aktivite gösterirler. UMP1 termolabildir ve tercihen pirimidin 5'monofosfatları (UMP, CMP ve dCMP) pH 7'de hidrolize eder.

UMP2 ise stabil sıcaklıkta 3'monofosfatlar gibi substratları optimum pH aralığında tercih eder. Ayrıca UMP2 substratlarından yüksek Michaelis konsantrasyonu ve max. hızıyla karakterize edilmiştir, optimum pH'sı asidiktir. Jel filitrasyon yöntemiyle incelenen UMPH1'in molekül ağırlığı 39 kDa, UMPH2'nin 44 kDa'dur (139, 140, 141).

Km değeri CMP için  $10^{-5}$  M ve izoelektrik noktası 5,0 pH'dır. Pirimidin 2'-3', siklik izomerlerine ve adenozin monofosfat ve bazı purin bazlarına karşı etkili değildirler. Hemolizatlarda, CMP/UMP substratlar aktivitelerini pH 7,2 / 6,7' de kazanırlar. Pirimidin nükleosidler ve inorganik fosfat güçlü bir şekilde 5'NT'nin aktivitesini inhibe eder. Bunun gibi çift değerli katyonlar, ağır metaller ve sülfhidril gruplarına karşı aktif olan maddeler de inhibisyonuna neden olur (45). 5'NT ağır metaller ve tiyollerle tepkime veren ve affinitesi olan kimyasallar tarafından indirgenir (3).

Farklı dokulardan saflaştırılmış mikrozomal ve plazma membran 5'NT'ların nükleosid di- ve trifosfatlar tarafından güçlü bir biçimde inhibe edildikleri görülmüştür. Enzimin tercih ettiği substrat AMP'dir ve bu nükleotid çalışmada kullanılmıştır. Ipata (64),  $\mu$ molar konsantrasyonlarda koyun beyinde hazırlanan ATP, UTP ve CTP'nin 5'NT'ı güçlü bir biçimde inhibe ettiğini görmüştür. Bu inhibisyon allosterik tiptir. Rat beyin, kardiyak doku, düz kaslarda, boğanın seminal plazmasından saflaştırılmış 5'NT'lerde de benzer inhibisyon ayrıca görülmüştür. Bitkilerde ise siklik-AMP 5'NT'yi güçlü bir şekilde inhibe eder (45).

Regülasyonu, hücrede birkaç fonksiyonla gerçekleşir. Bilinen fonksiyonlarından biri adenozin yolundan geçerek adenin nükleotidinin havuza kontrolsüz inmesini engelleyebilmektir. Ipata ve ark. (64) yaptığı çalışmada 5'NT ve adenilat deaminazın kurdukları regülatör sistem sayesinde, adenin ve guanin nükleotidleri arasında denge kurulduğunu bildirmişlerdir. Bu sistemde ATP, AMP metabolizması üzerinde çift etkiye sahip olmaktadır. AMP deaminasyonunda bir aktivatör ve

defosforilasyonunda inhibitördür. Sonuç olarak; guanil bileşiklerinin sentezi için İnosinik asitten AMP'ye bir geçiş söz konusudur. Son ürün GTP, adenilat deaminazı inhibe etmesine göre bu olay üzerinde geciktirici etkiye sahiptir ve bunu 5'NT 'a inhibitör etkisi olmaksızın yapar. Bu regülasyon açık değildir (45).

Bu enzimin fizyolojik fonksiyonu bilinmemektedir. Ancak çoğalmakta olan veya rejenerasyon yeteneği olan dokularda düşük aktiviteli olması nedeni ile nükleik asit metabolizmasında düzenleyici rol oynadığını düşündürmektedir. Plazma membranları üzerindeki safra tuzlarının deterjan aktivitesi ile sadece hepatobiliyer hastalıklarda 5'-nükleotidaz'ın dolaşıma salındığı düşünülmektedir (141).

Nükleotidazlar, sadece nükleosid monofosfatların normal hücresel katabolizmasında gerekli katalizleyici değil aynı zamanda nükleotid metabolizmasının potansiyel düzenleyicisidirler. Nükleotidazların fizyolojik fonksiyonları kolay anlaşılır olmamakla birlikte nükleotidaz aktivitesi ve sentezinin regülasyon mekanizması çeşitli vakalarda tanımlanmıştır (140).

Aynı zamanda 5'NT'nin dokularda kan akımının otoregülasyonunda anahtar bir rol oynadığı da belirtilmiştir. Bu hipotez enzim reaksiyonunun son ürünü olan adenzinin güçlü bir vasodilatör olmasını temel almıştır. Dokulara O<sub>2</sub> alımı arttığı zaman ATP ve ADP miktarı azalır ve AMP artar. Bu reversibl olarak nükleotidazların ATP ve AMP'yi inhibe edilmesi ve enzim aktivitesinin sitümülasyonundan dolayı AMP substrat konsantrasyonunu artırarak gerçekleşir. Adenzin üretiminin artışıdaki bu sonuç yeterli O<sub>2</sub> kullanımını ve kan akımını artırır. Ayrıca Mg<sup>++</sup> nükleotid inhibisyonunu geri dönüştürebilir ve bu iyon adenzin oluşumunun kontrolünde önemli olduğu gösterilmiştir. Adenzin nükleotidinin veya Mg<sup>++</sup>'un etki konsantrasyonları bilinmemektedir.

P5'NT, aktivitesi için Mg<sup>+2</sup>'a ihtiyaç duyar ve normal insanın kırmızı kan hücrelerinde çözünür halde bulunur. Retikulositler yüksek P5'NT

aktivitesine sahiptir, bu retikulositlerin gelişimlerini tamamlamalarında ve ribozomlar (RNA)'dan türeyen 5'ribonükleotidlerin katabolizmasında önemli bir rol oynar (45).

P5'N-1 ilk kez, 1970'lerin ilk yıllarında William Valentine ve ark. (133) tarafından hemolizli bir hasta incelenirken, eritrosit stoması içinde tayin edilmiştir. İlk hasta 8-10 g/dl'lik hemogloblin ile birlikte sferositik olmayan hemolitik anemiye sahiptir ve bunu bazofilik boyamayla ortaya çıkarılmıştır.

Bu çalışmada Embden-Meyerhof'un izlediği yoldan farklı değildir. Pentozfosfat yolunu değiştirmekte veya glutasyonla aynı yolu izlemektedir (133). Eritrositlerin biyokimyasal analizi, adenin nükleotidleri için düşünülen seviyeden beklenmeyen derecede daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Gözlenen adenin nükleotid seviyesi yüksek glutasyon seviyesine bağlıdır ve riboz-fosfat pirofosfokinazın aktivitesini de azaltmaktadır (109).

Eritrosit noksanlığının tam nedeni belirsizdir fakat hemolitik anemili ve bazofilik boyanmış, 3 uzak akraba üzerinde yapılan çalışmalar kalıtsallığın otozomal resesif bir modelini göstermiştir. Ayrıca eritrositlerde olduğu düşünülen adenin nükleotidleri gerçekte pirimidin nükleotidleridir. Pirimidin nükleotidleri normal olarak belirlenemezler (133).

İleri aşamalarda çalışmaları normal eritrositlerdeki 5'nükleotidaz aktivitesini ispat etmiştir. Eritrositler hemolitik anemi formunda olan bireylerde büyük ölçüde indirgenir (133).

P5'N-1 eksikliği kalıtsal hemolitik aneminin nedenidir, buna rağmen P5'N-2 eksikliği ile ilgili kabul edilmiş bilgi yoktur. Sonraki çalışmalar sonucu gösteriyor ki; P5'N-1 ve P5'N-2 ayrı genetik kodlarıyla birbirine bağlı olmayan enzimlerdir. İki izozim varolmasına rağmen, eski literatürlerde sıklıkla tek fonksiyonel varlık olarak dikkate alınmıştır ve bu literatürlerde pirimidin 5' nükleotidaz olarak adlandırılmıştır. 5'NT eritrositte kararsız

tutuma sahiptir. Sirkülasyonun ilk birkaç günü boyunca aktivitesinde önemli derecede sapma göstermektedir fakat sonra düşük seviyelerde kararlı kalmaktadır (14).

P5'N-1 fosfotransferaz aktivitesine sahiptir ve fosfat gruplarının değişik nükleotid akseptörlerinin arasına transfer edilmesi farmokinetik önem taşımaktadır. P5'N-1'in sustratları UMP, CMP ve dCMP'dir (3,4).

### 3.2.2. Fizyolojik Rolü

Eritrositlerde mitokondrinin bulunmadığı için gerekli enerjisini plazma glukozunun katabolizmasından ve de dolayısıyla ATP'den karşılar. Bunun sebebi de eritrositlerin ve bunların Hücrenin durumu bundan dolayı, ciddi derecede kendi purin nükleotidlerini koruyabilmesine bağlıdır (13). Purin nükleotidinin eritrositde homeostazi; degradasyon olayı ve kurtarma olayı arasında karmaşık bir dengededir ki bu denge anorganik fosfat seviyeleri, hücre içinde meydana gelen pH ve oksijenin genleşmesi olayları arasında oluşan karşılıklı etkileşim sonucu değişir (13,15). Eğer dolaşım yapan eritrositler esas olarak sadece aktif spesifik olmayan nükleotidazlar içeriyorsa o zaman adenin ve guanin nükleotidleri defosforile olur ve bir daha telafi edilemezcesine kaybedilir.

P5'N-1, kendi purin nükleotidlerinin değerli sayılan havuzunu korurken, eritrositlerin istenmeyen pirimidin nükleotidlerini yıkmalar. 5'N-1'in aktivitesi, ribozomların ve RNA'nın kırılmasından kaynaklanan nükleotid toplanmasını engellediği için, retikulosit devresi süresince P5'N-1'in özellikle önemli olduğu düşünülmektedir (59).

### 3.2.3. 5'Nükleotidaz Enziminin Klinik Önemi

P5'N-1 eksikliğinin belirtileri kronik hemolitik anemi veya hemoglobin miktarının düşüşüne sebep olan nedenlerle benzerlik gösterir. Kalıtsal sferositozis ve G-6-PD noksanlığına benzer diğer hemolitik anemilerin, P5'N-1 eksikliği durumuyla ilgisi belirlenmiştir, bu durum Gilbert sendromunun ortak kalıtsallığı için de geçerlidir (72, 92).

P5'N-1 eksikliğinin hastalarda, yüksek ATP sendromu gibi bir teşhis konularak hatalı bir tahmin yapılmıştır. Fakat eritrositlerin eksikliğine bağlı olarak ATP'nin miktarının yüksek çıkması pirimidin fosfattan ziyade adenin fosfatla birleşmesinden dolayı olmaktadır. Genetik olarak meydana gelen bu eksiklik pirimidin ribonükleotidlerinin normal defosforilasyonunu engeller ve otozomal resesif bir sendrom gibi düşünülür. Bu sendromda ribozpirofosfokinaz (RPK)'ın fazla miktarlarda azaldığı görülür, ayrıca glutatyon seviyesinde azalmanın görülmesi bir belirteçtir. Benzer sendromu içeren hemolitik anemide ve şiddetli kurşun zehirlenmesinde bazofilik renkle belirlenmiş eritrositler de görülmektedir. Ayrıca, bakır ve civa gibi diğer metallerin de enzimin aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Kalıtsal P5'N-1 eksikliğinde, biriken pirimidin nükleotidlerinden dolayı heksoz monofosfat yolunu (HMS) inhibe eder. Kurşunun diğer bileşiklere direkt inhibitörük etkisi glukoz -6- fosfat dehidrojenaz aktivitesi üzerinedir (31,32).

Bildirilen hastaların %10'undaki hakkında P5'N-1 eksikliği, gelişim ve öğrenmede geçikmeyle sonuçlanmıştır. Perulu bir ailede P5'N-1 eksikliği olan aynı ana babadan olmuş 7 çocuktan 3'ünün zeka seviyesi (IQ) 75 veya daha altında ölçülmüştür. Buna karşın aynı ailedeki hemolitik olmayan diğer çocuklar görünüşte normal zeka seviyesine sahiptirler. Hastalığı hafif olan



dört hastada ise öğrenme zorluğunun azalmakta olduğu anlaşılmıştır (14,130).

Karaciğerin fonksiyonu bozulunca genel metabolizmanın bozulması da doğaldır. Akut hepatitte karaciğer enzimleri hafif artış gösterirken 5'NT normal kalabilir. Anikterik karaciğer hastalıklarında ise 5'NT'in anormal artışlarına ALP, GGT ve LAP artışları eşlik edebilirler (56, 136).

Serum 5'-nükleotidaz ile alkalen fosfataz seviyelerindeki artış arasında iyi bir korelasyon görülmektedir. Bu nedenle alkalen fosfataz (ALP) yüksekliği saptandığı zaman, bu yüksekliğin karaciğer kaynaklı olup olmadığının ortaya konması açısından 5'-nükleotidaz düzeyinin ölçülmesi daha faydalı sonuçlar vermektedir. Ayrıca 5'-nükleotidaz karaciğerin metastatik tümörlerinin gelişimini izlemek için de kullanılabilir (141).

Viral hepatitte 5'NT seviyesi yükselir. Hepatitlere kolestaz eşlik ederse artış %100'ü bulur (55, 84). Hepatik komada normal değerlere rastlanır (47). Laennec sirozu, kronik alkoliklerdeki akut yağlı karaciğer infiltrasyonlarının çoğunda intrahepatik kolestaz mevcut olduğundan enzim artışları gözlenir. Karaciğerin parankim hücre hasarında artışa rastlanmaz (47,82). Sirozun erken evrelerinde ise 5'NT artışlarına rastlanır. Hastalık ilerlerken, enzimde progresif bir düşüşün olduğu literatür kayıtlarında mevcuttur (47, 129). Pankreas başı karsinomuna bağlı safra kanalı tıkanması halinde LAP, ALP gibi enzimlerin artması yanı sıra 5'NT çok artar. Bu olgulardaki patolojik durumların, ekstra-hepatik biliyer sistemin tıkanması, intra-hepatik kolestaz teşekkülü, karaciğerin infiltratif ve metastatik hastalığı ile karaciğer hücre nekrozu olduğu bildirilmektedir (52).

5'NT ve alkalen fosfatazın kolestatik sarılığın şekillenmesiyle serum düzeylerinin arttığı, hepatobiliyer hastalıklarda yükseldiği, kemik hastalığında ise normal olduğu bildirilmektedir. Bu iki durumu birbirinden ayırt etmek için

5'NT test olarak kullanılır. Özellikle bu vakalarda diğer biyokimyasal testler kemik ve karaciğer fonksiyon testlerinde belirleyici değildir (57).

Değişen derecelerde tıkanmaya bağlı olarak, sarılığın ilerlemesiyle 5'NT düzeyi yükselir. Sirozda enzim %50 kadar artar, fakat sirotik hastalık ilerlerken düştüğü literatürde kayıtlıdır (47). Hepatobiliyer hastalıklara özgü olarak enzim seviyesinde büyük bir artış görülür. Bunlara ilaveten, pankreas başı kanserleri, safra kanal bozuklukları olan ancak ikterik olmayan vakalarda söz konusu enzimin aktivitesinin tayini tanıya yardımcı olabilir (2, 26, 32, 47). İkterik olmayan hastalarda 5'NT yükselmesi karaciğerin radyoizotoplarla görüntülenmesini gerektirir, çünkü intrahepatik tümörlerde enzim çok artar (32). Çocuklarda ortaya çıkan neonatal hepatitten biliyer atreziyi ayırmak için de özel bir enzim olarak kabul görmüştür (31).

Sarılıkta, BTM (bone marrow transplantation) seyri süresince ALP aktivitesi orantılı değişirken, 5'NT ve ALT aktiviteleri sürekli yükselir. 5'NT kolestaziste ALP'den daha duyarlı bir belirteçtir ve yükselmesi kolestazis veya nekroza bağlıdır. Bundan dolayı sarılık oluşmayan kolestaziste, 5'NT'nin ALP'den daha iyi bir belirteç olduğu görülmüştür. Serumdaki bu yükselme total bilirubin artışından daha erken görülür. Hepatobiliyer hastalıklarda 5'NT aktivitesinin yükselmesi iki faktörle ilişkilidir. Birincisi; safranin çalışması durduğu zaman safradaki glukozidazlar GPI (glikozil fosfatil inozitol)'nın bir kısmını ayırabilirler ki bu da periportal hepatositler ve safra kanal hücrelerinin plazma membranındaki 5'NT zincirlerini koparabilir. İkincisi, safra tuzlarının temizleyici etkisi, serbest bırakılmış 5'NT molekülünün sirkülasyona girmesini kolaylaştırabilir (110). Gerçekte rat karaciğerinde kanala bağlı safranin etkileri üzerine yapılan çalışmalar serum 5'NT aktivitesinde artış olduğunu ortaya koymuştur (118).

Karaciğerden uzak dokularda ortaya çıkan karsinomlarda 5'NT aktivitesi değişmez. Karaciğere metastaz yapmış uzak doku tümörleri ile karaciğerin primer kanserlerinde harabiyet oranına bağlı enzim artışı olur.

Çoğu ikterik olmayan vakalarda 5'NT'nin anormal artışlarına rastlanmıştır (2, 52, 82). Belirlenen malignitenin radyoterapi veya kemoterapisindeki başarılı uygulamanın ardından 5'NT seviyeleri düşer. Böyle bir tedaviden sonrası düştükten belli bir süre sonra tekrar artan enzim seviyesi daha ileri bir tedavi uygulanması gerektiğini düşündürür (47). Karaciğere metaztaz yapmamış akciğer, mide, meme, uterus, kolon, böbrek veya mesane karsinomlarında 5' NT ile birlikte LAP ve ALP normal seviyelerde kalabilir (52).

Kemiğe metastaz yapmış kanserlerde 5'NT seviyelerinin değişmediğini yapılan çalışmalar göstermiştir. Kemik hastalıklarında ise 5'NT artışı nadir olarak görülmektedir (47).

52 gebe kadında yapılan bir çalışmada 5'NT aktivitelerinin gebelik boyunca değişmeden kaldığı bildirilmiştir (118). Gebe kadında ortaya çıkabilecek karaciğer ve pankreas başı kanserlerinin teşhisinde 5'NT'nin önemli bir belirteç olabileceği rapor edilmiştir (82).

Yumurtalık kanserine yakalanmış kadınların %50 kadarında 5'NT seviyeleri yükseldiği bu artışın karaciğer metastazını düşündürebileceği ileri sürülmektedir (14).

Normal lenfositlerin yüzeylelerinde 5'NT bulunur. Buna ekto-5'NT denir. Kronik lenfositik lösemilerde 5'NT yetersizliğine rastlanmıştır. Aktivitenin olmayışı bir enzim proteininin olmadığını veya fonksiyon bakımından anormal moleküllerin ortamda birlikte bulunabileceğini akla getirir. T-hücre lösemisinde düşük, B-hücre lösemisinde ise son derece düşük 5'NT aktivitesi olduğu kayıtlıdır (15).

Kan akrabalığı olan ebeveynlerin çocuklarının eritrositlerinde 5'NT aktivite yetmezliği sonucu non-spesifik hemolitik anemi ve hemolize ilaveten zeka geriliğine rastlanmıştır (15). Konjenital 5'NT noksanlığı kurşun zehirlenmesine benzeyen hemolitik anemi ile birlikte görülür. Eritrosit 5'NT

aktivitesinin düşmesi, kurşunun hemoitik toksisitesi ve kanda kurşun birikmesine sebep olur. Kurşun intoksikasyon anemisinde bu durum önem kazanır. Bu enzim retikülositlerde fazlaca bulunmaktadır (130).

Serum 5'NT aktivitesinde Nishimure ve Teschke (99) kronik alkol tüketiminden sonra serumda önemli bir artış bulmuşlardır. 5'NT hepatosit endoplazmik retikulumunda sentezlenmektedir. Daha sonra sentez yolunun olduğu yer olan Golgi cisimciğine ve oradan da plazma membranına geçmektedir.

Gebe ve kemik hastalığı olanlarda 5'NT yükselmez, bu yüzden çocuklarda ve gebelerde karaciğer hastalıklarının ayırımında değerlidir. 50 yaşına kadar yaşla beraber yükselir. Normal değerleri 3–14,9 U/L'dir. 5'NT, ALP gibi biliyer obstrüktif ve karaciğerin infiltratif, hastalıklarının tanısında kullanılır. Genelde ALP ve 5'NT arasında bir korelasyon olmasına rağmen, bazen ALP hepatobiliyer hastalıklar dışında, örneğin gebelerde, kemik hastalıklarında da artığından ALP artışının karaciğer kökenli olup olmadığını ayırmak için 5'NT aktivitesi ölçülür. Hepatobiliyer hastalıklarda 5'NT, ALP ve GGT'den daha hassastır. GGT/5'NT oranı biliyer siroz tanısında yüksek bir spesifiteye sahiptir. Bu enzim özellikle karaciğer tümörlerin taranmasında GGT ve ALP'ye göre daha duyarlı ve özgül olup, daha az yanlış (+) sonuç verir (118).

### 3.3. LÖSİN AMİNOPEPTİDAZ (LAP)

Losin aminopeptidaz (LAP) diğer adıyla L-Lösil-peptid hidrolaz bir proteolitik enzimdir. Tüm dokularda protein ve polipeptidlerin N-terminal ucundaki aminoasitleri (özellikle losin içeren) hidrolize eder (132).

Molekül ağırlığı 324 000 Da olup, 15  $\alpha$ -heliks ve 11  $\beta$ -katlanmış yaprak yapısı hakimdir. Her birinin molekül ağırlığı 54 000 Da olan, 6 alt birimden ve 12 çinko iyonundan oluşan heksamerik bir yapıya sahiptir. 487 aminoasit ve subüniteleri çinko iyonu içerir. Yapıda bulunan amino asitler  $\alpha$  ve  $\beta$  gibi iki katlı bir molekül oluştururlar (139,140).

Aktivitesini en iyi pH 8'de gösterir ve en iyi 238 nm dalga boyunda okunur. Özellikle karaciğerin biliyer epiteli başta olmak üzere, tüm dokularda, böbrek proksimal tubulus epitelyumu başta olmak üzere fırçamsı kenarında membran enzimi olarak, pankreasta, prostatta, testiste, ince barsakta ve beyinde bulunur. Beyin yaşlandıkça ve geliştikçe LAP'ın serebral dağılımı azalır. Ayrıca özellikle plasental LAP'ın nöronal gelişimi ve beyinde nöronal fonksiyonların regülasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (74). Lenste ve fibroblastlarda da bulunan mikrozomal bir enzimdir (6,93).

Enzim, EDTA ve sitrat ile pH 8–8,5'te kuvvetli bir şekilde inhibe olur. Ayrıca  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$  ve  $\text{Pb}^{+2}$  iyonları da enzim için inhibitörük etki gösterir (74).

LAP aktivitesinin, prostat kanseri ve prostat hiperplazisi (107), testis tümörleri (79), meme tümörleri (50), jinekolojik malignite (81), malign melanom (22) gibi tümörlerde arttığı ve bu tümörlerin tedavisi sonrasında

normale döndüğü için bu tümörlerde marker olarak kullanılabilirdiği bildirilmiştir (50).

LAP'ın serumdaki artışı özellikle hepatobiliyer hastalıklarda daha fazla görülür. Pankreas kanseri, akut pankreatit, hepatit, siroz, metastatik karaciğer kanseri, tıkanma sarılığı ve gebelikte de ayrıca serum değeri yükselir. LAP, sarılıkta ve sarılık olmayan hastalarda, hepatik metastazların ortaya çıkmasında ALP'den daha duyarlı bir indikatördür. Bununla beraber tıkanma sarılığı ile viral hepatitlerin ayırıcı tanısında önemli değildir. Bu enzim başlangıçta spesifik olarak pankreatitte arttığı düşünülmüşse de sonraki incelemelerde pankreas karsinomunda, tıkanma sarılıklarında ve karaciğerin metastatik lezyonlarında da yükseldiği gözlenmiştir (75).

Serum ve idrarda LAP aktivitesinin araştırılması pankreas kanseri ve sarılığın ayırıcı teşhisi ile sarılığı olmayan hastalarda karaciğer hastalıklarının ortaya çıkarılmasında LAP tayini için oldukça önemlidir (47).

Rutenburg ve ark. (112), Goldberg ve ark. (48) ve Pinada ve ark. (105) yaptıkları çalışmalarda, pankreas tümörlerinde LAP'ın serum ve idrardaki seviyelerini araştırmışlar ve dikkati çekecek kadar yükseldiğini ileri sürmüşlerdir. Aynı araştırmacıların yaptıkları çalışmada, sirozlu ve hepatitli hastaların %50'sinde serum ve idrar LAP aktivitelerinin arttığını gözlemlemişlerdir (48). Pankreas ve karaciğer kanserleri hariç, mide özafagus, duodenum, kolon, meme, boyun, yumurtalık, uterus, akciğer, prostat, böbrek, idrar yolları, deri, tiroit, ve kemik kanserlerinde LAP seviyesinde hemen hemen hiç artış bulunmadığını bildirmişlerdir (75).

İnsan serumunun birçok aminopeptidaz içerdiği ve bu aminopeptidaz aktivitelerinin gebelik süresince arttığı belirtilmiştir. Plasental aminopeptidazların, kinin, anjiyotensin, oksitosin ve vazopressin gibi aktif peptid hormonlarının seviyelerinin düzenlenmesinde ve normal gebelik

süresince fizyolojik aktivitelerini sürdürmelerinde rolü olduğu bildirilmektedir (75).

Kobayashi ve ark.nın (81), 29 over kanseri hastalarında yaptıkları çalışmalarında %89,7'sinde plasental LAP'ın anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Yapılan bir çalışmada (79), LAP düzeyleri ile spermatik dansite arasında direk bir korelasyonun olduğu bildirilmiştir. Bu da erkek fertilitesinde bu enzimin önemli olduğunu göstermektedir. Seminom veya seminom dışı tüm benign ve malign testis tümörlerinde LAP düzeyi yüksektir ve tümörün tedavisinde serum enzim düzeyi gerilemektedir (49).

Gebelikte özellikle plasental LAP nedeniyle fizyolojik olarak yüksektir. Gebelik boyunca yükselir ve gebeliğin sonuna doğru pik yapar. Karaciğerin obstrüktif, infiltratif lezyonlarında ALP ve 5'NT kadar LAP da duyarlıdır. Siroz ve hepatit gibi hepatosellüler hastalıklarda pek artmaz nadiren 450 U/L'yi aşar. Kemik hastalarında yükselmeyen bu enzim çocuklarda ve erişkinlerde (gebeler hariç) aynıdır. Normal değerleri erkekte 80–200 U/L, kadında 75-180U/L'dir. LAP'ın idrarla atılımı tubuler nefropatilerde artar (93).

Gebeliğin son 3 ayı boyunca serum LAP aktivitesi önemli derecede artmaktadır. Doğumdan 6–8 hafta sonra LAP aktivitesi normale döner. Çeşitli karaciğer hastalıklarında LAP değerleri ALP değerlerine göre paralel olmasına karşın kemik hastalıklarında LAP normal sınırlar içerisindeyken ALP değerlerinin arttığı kaydedilmiştir (75).

Inokuma ve ark. (63) 1999 yılında 46 Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) hastasında LAP düzeyini ölçmüşler; hastaların %71,7'sinde (33 hastada) yüksek bulmuşlardır. Ölçülen LAP değerleri ile; AST, ALT, GGT ve LDH değerleri arasında bir korelasyon olduğunu, ALP değerleri arasında ise korelasyon olmadığını tesbit etmişlerdir. Böylece LAP'ın SLE hastalarında bir

indikatör olabileceği savını ortaya atmışlardır. Aynı çalışmada romatoid artrit olgularında LAP normale yakın bulunmuştur (63).

Özcan ve ark. (103) Morkaraman ırkı koyunlarda yaptıkları çalışmada idrar LAP aktivitesinin gebelik boyunca artığını gözlemlemişlerdir. En yüksek artışın gebeliğin 50. gününde olduğunu ve LAP'ın gebelik teşhisinde kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.



### 3.4. AMİNOTRANSFERAZLAR

Fizyolojik durumlarda serumda transaminaz aktivitesi azdır ve hayvan ırklarına göre değişir. Serum transaminaz aktiviteleri yaşı, cinsiyet, açlık, beslenme, stres ve çevresel faktörler tarafından etkilenmektedir (39, 95).

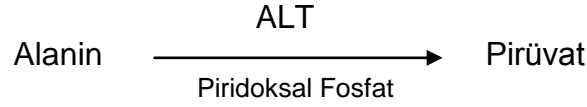
Protein metabolizmasında amino asitlerin başka maddelere çevrilmesi yeniden sentezi veya yıkımlanması transaminasyonla başlar. Transaminasyon reaksiyonları transaminazlar (aminotransferazlar) tarafından katalize edilirler. Aminotransferazlar, amino asit metabolizmasına ilk olarak katılan ve amino asitlerin amino gruplarının transferini katalizleyen enzimlerdir. Aminotransferazlar, aminoasitlerin amino gruplarını  $\alpha$ -ketoasitlere transferini katalizleyen ve koenzimi pridoksal 5 fosfat olan hücre enzimleridir (133).

Aminotransferazlar; aspartat aminotransferaz (AST, serum glutamik oksaloasetik transaminaz, (SGOT) ve alanin aminotransferaz (ALT, serum glutamik pürivik transaminaz, SGPT) , karaciğer hasarını ve karaciğer hücre nekrozunu belirlemede en sık kullanılan enzimlerdir. İlk kez 1955 yılında, AST aktivitesi viral hepatitlerde araştırılmış, arttığı görülmüştür. Daha sonraki çalışmalarda, diğer karaciğer hastalıklarında da bu enzimin yüksek olduğunu saptanmıştır. Sonraki çalışmalarda ise, AST ile birlikte ALT yüksekliği de saptanmış ve bu enzimlerin karaciğer hücre hasarının göstergeleri olduğu ileri sürülmüştür. Ancak bu enzim testlerindeki yükseklik, birçok karaciğer hastalığında mevcut olup, hastalıkların ayırıcı tanısında sınırlı bir değere sahiptir (141).

Protein ve karbonhidrat metabolizması arasında önemli bir geçit görevi yaptığı ve glukojenik etki gösterdiği bildirilen transaminazlar çeşitli doku ve organlarda yaygın olarak bulunur. Hemen hemen tüm hayvansal dokularda transaminazlara rastlanır ( 25,95, 97, 131).

### 3.4.1. ALANİN AMİNOTRANSFER (ALT)

Alanin aminotransferaz (ALT) önceleri glutamopirüviktransaminaz (GPT) adıyla anılırdı. Esas olarak karaciğerde bulunursa da kalp, iskelet kası ve böbrekte de vardır. ALT, aşağıdaki reaksiyonu katalizler (71).



ALT'nin serumdaki normal aktivite sınırı 5–55 IU/L arasındadır.

NADH'in oksidasyon hızı ALT'nin katalitik aktivitesi ile orantılıdır ve dolayısıyla bu hız 340 nm 'de absorbans azalmasının ölçümüyle belirlenir. AST ve ALT ölçümleri için serum numunesi laboratuvar ısısında 48 saat, buzdolabında 2 hafta dayanıklıdır.

Transaminaz aktivite ölçümü, miyokard enfarktusu tanısı için çok yararlıdır. Kaynağının karaciğer olması bakımından, karaciğer hastalıklarında ALT, kalp hastalıklarında ise AST daha önemlidir (71).

Karaciğer hastalıklarında analiz işlemi, her iki transaminazı da (AST ve ALT) içermelidir. Viral ve toksik hepatitlerde gerek ALT ve gerek AST, normal üst sınırının 10–100 katına varan artışlar gösterir (29). Kısmi tıkanıklık, kronik hepatit, alkolik karaciğer hastalığı immün yetmezlikli viral hepatit ve sirozda 300 IU'nin altındadır (106). Akut safra yolları tıkanmalarında 24–48 saat içinde transaminaz değeri binlere ulaşır. Tıkanıklık giderildiğinde hızla düşer. Alkolik karaciğer hastalığının tespitinde AST/ALT oranı önemlidir. ALT < 300 IU ve AST/ ALT >2 ise alkolik karaciğer hastalığı düşünülür. Serum transaminazların diagnostik değeri düşüktür. Toksik hepatit'de akut tıkanmalarda 3000 IU'den fazla olsa bile, hastalık nedeni ortadan kalktığında karaciğer hızla iyileşir, tersine durumda sirotik hastaların çoğunda ve terminal karaciğer hastalarında normale yakın değerlerde olabilir (106). Akut hepatitlerde AST ve özellikle de ALT artışı sarılık semptomundan önce başlar (29).

ALT düzeyinde artış, gerçekte hepatik bir sitoliz işaretidir. Bu da, hastalığın seyri ve olası nüksünü izlemeye yarar. Transaminaz düzeyinde artış, anikterik hepatitlerin tek biyokimyasal bulgusudur.

Kronik hepatitlerde, transaminaz artışı orta düzeydedir ve hücre nekrozunun yaptığı parankim zedelenmesini yansıtır. Karaciğer sirozunda ALT ve AST düzeyi değişmemiş de olabilir, normal üst sınırının iki katına ulaşan artışlar da gösterebilir (41).

Safra yollarının tıkanması, transaminazlarda orta derecede bir artışa neden olur, ancak normale dönüşler hızlıdır. ALT'nin yükseldiği diğer durumlar: Progressif müsküler distrofi, akut pankreatit, dermatomiyozit, akciğer embolisi, gangren, kas yaralanmaları ve cerrahi sonrası hemolitik hastalıklar, enfeksiyöz mononükleozdur (29,106).

### 3.4.2. ASPARTAT AMİNOTRANSFERAZ (AST)

Aminotransferazlar bir alfa keto aside, bir aminoasidin amino grubunun transportunu sağlayan ezimler sınıfıdır. Bu transferle aminoasit karşılığı olan alfa keto asite dönüşür. Tepkime öncesi  $\alpha$ -keto asit ise karşılığı aminoasit verecektir. Transaminazlar (veya aminotransferazlar) proteinlerin ve karbohidratların birbirlerine dönüşümlerinde etkili olurlar (29).

AST aşağıdaki reaksiyonu katalizler.



Aspartat aminotransferaz aktivitesinin tanımı klinik olarak önem taşır ve  $\text{NADH} \cdot \text{H}^+$  koenzimi kullanan reaksiyonlarda aktivite koenzimin absorbansındaki azalmanın ölçümü ile yapılır. Bu testin laboratuvar tekniği iki aşamalıdır (133).

NADH oksidasyon hızı, AST'nin katalitik aktivitesi ile orantılıdır. Bu hız 340 nm'de absorbans azalışı yöntemi ile belirlenir. Çok yüksek değerlerine ciddi doku hasarlarında rastlanır (akut hepatitis, ezilme injürileri ve doku hipoksiası gibi) (71).

Aminotransferazlar hücre içi ortamlarda sentezlenirler ve hücre membranının geçirgenliğinin değişimi veya hücrenin parçalanması sonucunda kana geçerek serumda yüksek konsantrasyonlarda saptanırlar ve genellikle doku ve organlardaki patolojik değişimlerin göstergesi olarak

yorumlanırlar. Hafif hücre hasarlarında sitoplazma enzimleri, kana geçerken ağır hücre hasarlarında mitokondri enzimleri serumda daha çok gözlenir (20, 95, 133).

Karaciğer, iskelet ve kalp kası, böbrek, beyin, pankreas, akciğer, lökosit ve eritrositlerde bulunur. Retiküloendoteriyal hücrelerince katabolize olurlar. Normalde idrarda hemen hemen hiç bulunmazlar. Hem sitozol hem de mitokondride bulunur. Karaciğer hücre hasarı, hepatosellüler nekrozu gösterir. Transaminazların tekrar yükselmeye başlaması veya yükseldiğinde karaciğer iltihabı veya nekrozunun nüksettiğine işarettir. Bu yüzden yapılacak seri ölçümler karaciğer hastalığının gösterir. Başlıca kalp ve sırasıyla karaciğer, böbrek, iskelet kası ve alyuvarlarda AST bulunur (19).

AST artışı, olası karaciğer bozukluk derecesinin bir belirtici olduğu gibi enfarktus sonrası kalp yetmezliğinin belirteci de olabilir. Miyokard enfarktusunda, AST artışı 6. saatte başlar, 36. saate kadar artış sürer ve sonra 5–6.günlere kadar normale döner. Bu artış çok belirgindir ve normal üst sınırın 10–100 katıdır. Şok ve hipoksiyle beraber olan dolaşım yetmezliğinde ALT ve AST değerlerinde normal üst sınırın 10–1000 katına varan artışlar olur. Akciğer embolisi ve böbrek enfarktusunda da AST artışı gözlenir (133).

Kramer ve ark. (83), AST aktivitesini at, sığır, domuz, köpek ve civcivlerin hemen hemen tüm dokularında saptadıklarını, en yüksek AST aktivitesinin kalp, iskelet kası, karaciğer ve böbreklerde, daha az olarak akciğer, dalak ve barsaklarda bulunduğunu, kalp kasındaki AST aktivitesinin karaciğer ve diğer dokulardan daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

At, sığır, koyun ve keçilerin doku ALT aktiviteleri daha düşüktür. Karaciğere spesifik olmamasına karşın, bu tür hayvanların karaciğer hastalıklarının tanısında ALT'den çok AST kullanılmaktadır (19,20,24).

### 3.5. GAMMA GLUTAMİL TRANSFERAZ (GGT)

Gama-Glutamil Transferaz ( $\gamma$ -GT veya GGT) veya gama-glutamil transpeptidaz temel olarak karaciğer, böbrek, pankreas ve prostat dokularında yerleşmiştir: C terminal Glutaminin bir peptitten diğer bir peptide veya L-aminoasitlere aktarılmasını katalizleyen mikrozomal bir enzimdir (71).

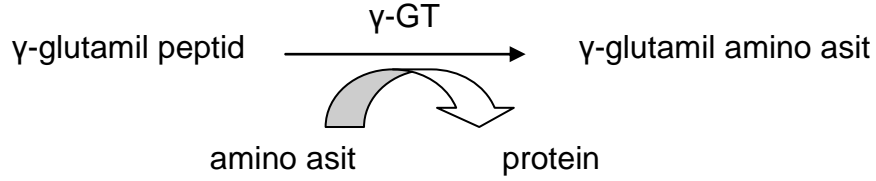
GGT, C terminal glutamil gruplarına bağlanan bir karboksil peptidazdır ve onları peptit veya glisilglisin gibi diğer maddelere dönüştürür. Enzim glutatyon metabolizmasında görev alır ve mikrozomal membranlar (hücreSEL GGT aktivitesinin % 95'i) ve sitozol (%5)'de bulunur. Birçok hücrede bulunur; renal konvolut tübül hücreler, hepatositlerin kanaliküler yüzeyleri ve safra kanalı epitelyumu en yüksek miktarda GGT aktivitesi içerir. Serum GGT aktivitesi birincil olarak hepatik orjinlidir.

Genelde karaciğer hastalarında hassas bir indikatör olarak kullanılır. Alkolik karaciğer hastalarında transaminazlar ve ALP'dan daha spesifiktir. En fazla viral hepatit, kronik veya subakut hepatit, siroz, intra veya ekstrahepatik safra yolları tıkanmaları, alkolik karaciğer hastalığında, primer veya metastatik karaciğer tümörlerinde; daha az olarak da konjestif kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü sonrası ve pankreas karsinomlarında da artabilir. Gebelikte pek yükselmez (71).

Yüksek ALP kaynağını saptamada GGT yardımcıdır. GGT kemik hastalığında yükselmez, Barbitürat, fenitoin ve fazla alkol alan kişilerde transaminazlar, ALP ve bilirubin yükselmeden GGT yükselebilir. Sarılığın ayırımında transaminazlar ve ALP'a ek bir fayda sağlamaz. GGT/5'NT

oranının 1,9 olması %40 oranda sensitif, %100 oranda spesifik kolestaz ve biliyer siroza işarettir (24).

Enzim, katalitik aktivitesini transfer ve hidroliz reaksiyonlarında gösterir:



Bu enzim glutamil radikalinin hücre zarı boyunca taşınmasında görev yapar.

Serum GGT aktivitesinde artış alkolizm, karaciğer kanserleri, kolestaz, ilaç zehirlenmesi, pankreas ve karaciğer bozukluğu olayında görülür. Miyokard enfarktüsü ve beyin lezyonları olgularında da artış olabilmektedir.

Önemli ölçüde alkol alan herkeste, serum GGT'ı artar. Alkol alımı, GGT artışı ile anikterik toksik bir hepatite neden olmaktadır. Alkolik sirozda, GGT artışı çok önemlidir. Sağlıklı bir kişide alkol alımına son vermeden itibaren GGT'ın normale düşüşü oldukça hızlı iken, sirotiklerde GGT düzeyi düşme gösterse bile, tümüyle normale dönemez. Öte yandan bir olguya sadece plazma GGT düzeyi yüksek çıktığı için alkolik tanısı konulmaz.

Karaciğer metastazlı kanserlerde ve karaciğer primer kanserlerinde GGT' de hızlı ve önemli bir artış bulunur. GGT'nin serumdaki artışı, genellikle hepatik metastaz varlığının ilk bulgusudur.

Tıkanmalı her sarılıkta GGT' da genellikle alkale fosfatazdaki artışa eşlik eden hızlı bir yükselme görülür. Gebeliğin kolestatik sarılığında, plazma GGT aktivitesinde artış olmaz.

Antikoagulantlar, antiepileptikler, nörepileptikler ve bazı oral kontraseptifler gibi çok sayıda ilaç GGT düzeyini artırır. Plazma GGT, karaciğer hastalığının yokluğunda, antikonvulzant ve tüberküloz ilacı (rifamsin) alınmalarıyla da yüksek ölçülmektedir. Enzimin aktivitesindeki bu yükseklik hücre hasarından değil, hücrelerde enzimin üretiminin artmasındandır.

Akut pankreatitis ve pankreas başı kanserinde, GGT düzeyinde bir artış görülür. Viral hepatitlerde GGT düzeyini belirleme tanıda yarar sağlamaz. Bu gibi olgularda, plazma transaminaz aktivite ölçümü çok daha duyarlı bir göstergedir. Normal sınırının yaklaşık 3 katına varan hafif veya orta şiddetteki artışların yorumu özellikle güçlük arz eder. Transaminazlardan bağımsız olarak GGT'nin çok yüksek oluşu, büyük miktarda alkol ve antikonvülsant ilaçlar alınması veya karaciğer hastalığına bağlı olabilir.

Birçok yazara göre, GGT sadece karaciğerde değil, fakat aynı zamanda böbrekte ve pankreasta da yüksek konsantrasyonda vardır. Ancak, plazmadaki aktivitesinin ölçümü, hepatobiliyer hastalığının duyarlı bir indikatörü kabul edilir. Biliyer obstrüksiyonda plazma GGT aktivitesi, ALP'den önce yükselebilir.

Plazma GGT'nin alkolik karaciğer hastalığında çok yüksek olması tipiktir. Bu yükselme, alkolün yine enzim aktivitesini uyarmasına bağlanmaktadır. Alkolik karaciğer hastalığı olan kimselerin yaklaşık %70 'inde bu enzim yüksek ölçülür. Alkol alınımını bu hastalar durdursalar bile, enzimin kandaki düzeyi 3-4 hafta daha yüksek kalmaktadır (31).

GGT'nin karaciğer dokusunda farklılık göstermektedir. İnsan, sığır, koyun ve atların karaciğer GGT aktivitesi nispeten yüksektir (20,23, 83).



Enzim aktivitesinin günün saatleri ve yaş gibi biyolojik faktörlerden etkilendiği, biyolojik ve stres faktörleri altında değiştiği bildirilmiştir (95).

Sanda ve ark. (115) ve Schumacher ve ark. (117) farklı yaşlardaki sığırlarda serum AST, GGT aktivitelerinde yeni doğan ve çok genç hayvanlarda erişkinlere nazaran artış görüldüğü bildirilmektedir.

GGT karaciğer hastalığının teşhisinde çok önemli bir enzim olmakla beraber karaciğerdeki küçük değişiklikler için çok hassas bir indikatördür. Ayrıca 5'NT ve GGT'nin hepatik metastazın tespitinde çok spesifik ve hassas olduğu belirtilmiştir (80).

Lum ve Gambino (89) yaptıkları araştırmada, serum GGT ölçümü karaciğer ve kemik hastalıklarında ALP kaynağının belirleyicisi olduğunu bildirmektedirler. Çalışmalarında; GGT primer ve metastatik karaciğer tümörlerinde neredeyse hiç değişmez bir biçimde arttığını ve bu sonucun diğer bir çok çalışmalarla da desteklendiğini vurgulamışlardır.

Aronsen (7) ise, 153 hastada yaptığı çalışmada ALP, GGT ve AST ile karaciğer metastazının tespitini yapmış ve bu sonucu %93 doğruluk payıyla belirlerken, sadece GGT ölçümüyle bu sonucun tek başına doğruluk payının %90 olduğunu belirtmiştir.

Serum GGT aktivitesinin belirlenmesi kolestaz ve safra kanalı proliferasyonunun hassas ve spesifik bir göstergesidir. Serum GGT seviyeleri kolestaz sırasında serum ALP aktiviteleri ile birlikte paralel artış gösterdiğinden küçük hayvanlarda değerlendirme kriteri olduğu bildirilmiştir (83).

## 4. MATERYAL ve METOT

### 4.1. Materyal

Bu çalışmada 50'si Brusellalı, 50'si sağlıklı olmak üzere 100 baş ineğin v. jugularisinden alınan kan örneklerinden elde edilen serumlar incelenerek, 5'NT, ALT, AST, GGT ve LAP düzeyleri tayin edildi. 24.01.2006–27.02.2006 tarihleri arasında Kars ili merkez köylerindeki hasta ve sağlıklı sığırlardan alınan kan numuneleri kullanıldı. Çalışma grubuna seçilen, kontrol grubu hayvanların hiçbirine daha önce Brucella tedavisi yapılmamıştır. Brucella tanısı, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapılan serolojik testlerle belirlendi.

Hasta ineklerin yaş ortalaması  $2 \pm 0,2$ 'dir. Hasta grubu oluşturan 50 ineğin 35 tanesi (%70) 1 ay önce, 10 tanesi (%20) 15 gün önce ve 5 tanesi (%10) 1 hafta önce atık yapmış ve bu gruba yapılan Rose Bengal testi sonucu Brucella tanısı konmuştur. Enfekte hayvanlara bu sürede hiçbir ilaç tedavisi uygulanmamıştır.

Kontrol grubu klinik ve laboratuvar test sonuçları yönünden sağlıklı oldukları bilinen, hasta grubuyla, yaş ve cinsiyet olarak benzer hayvanlardan oluşturulmuştur. Kontrol grubunu oluşturan 50 ineğin yaş ortalaması 2-3 yıldır.

Hasta ve kontrol grubu olmak üzere her bir ineğin vena jugularisinden vakumlu serum tüplerine alınan kanlar oda ısısında yaklaşık 1 saat bekletildikten sonra, Kafkas Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı

Laboratuvarında, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri elde edildi. Serumlar plastik ependof tüplerine (her numuneden ikişer adet olmak üzere) alınarak bir bölümü 5'NT ve LAP tayini için -20°C'de derin dondurucuya yerleştirildi. Kalan serumlarla aynı gün içerisinde serum ALT, AST ve GGT aktiviteleri saptandı.

5'NT ölçümleri Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında yapılan analizlerde elde edilen kromatogramlarda piklerin tam olarak ayrılabilmesi nedeniyle, çalışmanın kalan kısmı Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

## **4.2. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler**

### **4.2.1. Kullanılan Cihaz ve Laboratuvar Malzemeleri**

- Shimadzu LC-3A marka HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi)
- Spectra marka spektrofotometre
- pH metre
- Hassas terazi
- Eppendorf marka 20-100 µL ve 100-1000 µL otomatik pipetler
- Labinco marka Karıştırıcı
- Su banyosu
- Ultrasonik yıkayıcı
- Plastik ve cam malzemeler

#### 4.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Kullanılan kimyasal malzemelerin hepsi analiz için gereken saflıktaydı.

- Uridin (Sigma)
- Uridin 3'-monofosfat (Sigma)
- Potasyum hidroksit (Sigma)
- Potasyum di-hidrojen fosfat (Sigma)
- TRIS (Merck)
- Metanol (Merck)
- Hidroklorik asit (Merck)
- Magnezyum klorid (Merck)
- 1-Dekanosülfonik asid (Sigma)
- di-Sodyum hidrogen fosfat (Merck)
- TCA (Merck)
- Sodyum nitrit (Merck)
- Etilendiamin dihidroklorid
- $\beta$ -Naftilamin (Merck)

### **4.3. Kullanılan Metotlar**

#### **4.3.1. ALT, AST ve GGT Ölçümü**

AST, ALT ve GGT aktiviteleri günlük taze serumlarda Emapol marka ticari kitle kolorimetrik enzimatik metotla spektrofotometrede ölçüldü.

#### **4.3.2. 5'NT Ölçümü**

Bu enzimin kontrol grubunda ve hasta grubundaki ölçümleri Sakai ve arkadaşları (1982) tarafından yapılan yöntemle HPLC sisteminde yapıldı (113).

Enzim tarafından substratın tüketilmesi sistemine dayanan analizde 5'NT için substrat olarak UMP (uridin monofosfat) kullanıldı.

#### **4.3.3. Çözeltilerin Hazırlanması**

50 mM 250 ml hazırlanan UMP çözeltisinden 160 ml alınarak üzerine 1 M 10 ml Tris eklendi, üzerine 1,5 M HCL çözeltisinden dikkatlice eklenerek çözeltinin pH'sı 7,7'ye ayarlandı. Toplam hacim 200 ml oluncaya kadar distile

su eklendi. Bu çözeltideki UMP'nin konsantrasyonu 3,12 mM'dür. Hazırlanan 50 mM Tris-HCl tampon (pH 7,7) çözeltisi – 20 ° C'de 1 ay dayanmaktadır.

#### 4.3.4. Enzim İnkübasyonu

Her bir numune için ayrı ayrı ependorf tüpleri içinde reaksiyon karışımı hazırlandı. 100 µL seruma 300 µL distile su eklendi, bu karışım enzim solüsyonu olarak kullanıldı. Enzim solüsyonundan 150 µL üzerine 200 µL UMP-Tris tamponu ve 25 µL MgCl<sub>2</sub> eklendi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bir saatin sonunda reaksiyon karışımı çabucak kaynayan suda 3 dakika reaksiyonun durması için bekletildi. Bu sürenin sonunda reaksiyon karışımı 2 kat suyla dilüe edilerek 22 500 g'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı HPLC'de analiz için ayrıldı. Bu reaksiyon karışımı –20 °C'de 6 hafta dayanmaktadır.

#### ***Çalışma reaktifleri***

##### a.Reaksiyon Tamponu

---

50 mM Tris-HCl  
150 mM MgCl<sub>2</sub>  
3,12 mM UMP (uridine 5'monophosphate)

---

**b.Reaksiyon Karışımı**

---

200 µL	Reaksiyon tamponu+substrat
25 µL	Mg <sub>2</sub> Cl
150 µL	Distile Su
50 µL	Serum
TOPLAM	425 µL

---

Her bir numuneden 20 µL alınarak HPLC'de çalışıldı. Her numune verilışinden önce enjektör distile suyla yıkandı.

**4.3.5. HPLC'de Analiz**

Kromatografik sistemde cihaz olarak Shimadzu LC-3A (Shimadzu, Japan) kullanıldı. Bu cihaza uyumlu LC-3A model pompa ve görünür bölge spektrofotometresi, ters faz (reverse-phase) kolon ( Shodex ODSpak, 4.6 x 250 mm 5 µm), analiz için kullanıldı. Mobil faz % 5 metanol çözeltisi, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0,25 mM 1-dekanosülfonik acid çözeltisi içermektedir. Akış hızı, 1,0 ml/dk, kolon sıcaklığı 40 °C'dir. 260 nm dalga boyunda kromatogramlar elde edildi. + 4 °C'deki örnekler sırasıyla 20 µL HPLC enjektörü ile cihaza enjekte edilerek kromatogramları elde edildi.

## Mobil Faz

---

% 5	Metanol
0,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,25 mM	1-dekanosülfonik asit

---

## HPLC Koşulları

---

Akım Hızı	1,0 mL/dak
Kolon	4.6 x 250 mm 5 µm por genişliği olan C 18 reverse faz kolon
Süre	UMP 6 dakika, Uridin 3 dakika yürüdü.
Abs. dalga boyu	260 nm'de okuma yapılarak kromatogramlar elde edildi.

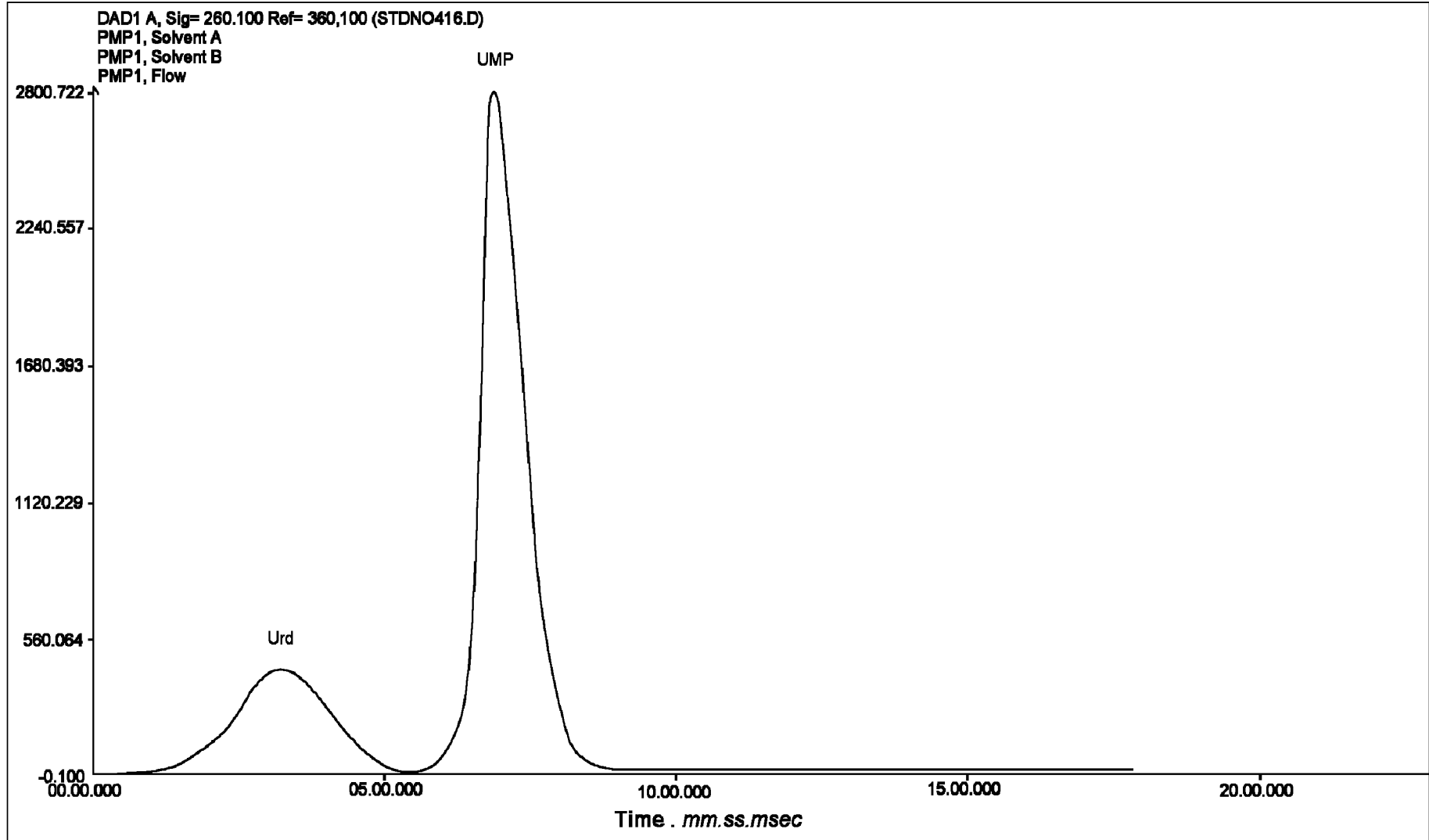
---

Her çalışma gününde numuneler ile analize başlamadan önce substratlarla standart kromatogramlar tekrar elde edildi ve hesaplamalar aynı günde çalışılan numuneler için, o güne ait standart kromatogramlara göre yapıldı. Çalışmada kullanılan reaktif tamponu, HPLC'de mobil fazı oluşturan potasyum fosfat tamponu +4 °C'de muhafaza edildi.

25 numunede bir, fosfat tamponu ile 5 dakika süreyle kolon yıkaması yapıldı. Substrat ve ürün için elde edilen kromatogram Şekil 2'de verilmiştir.



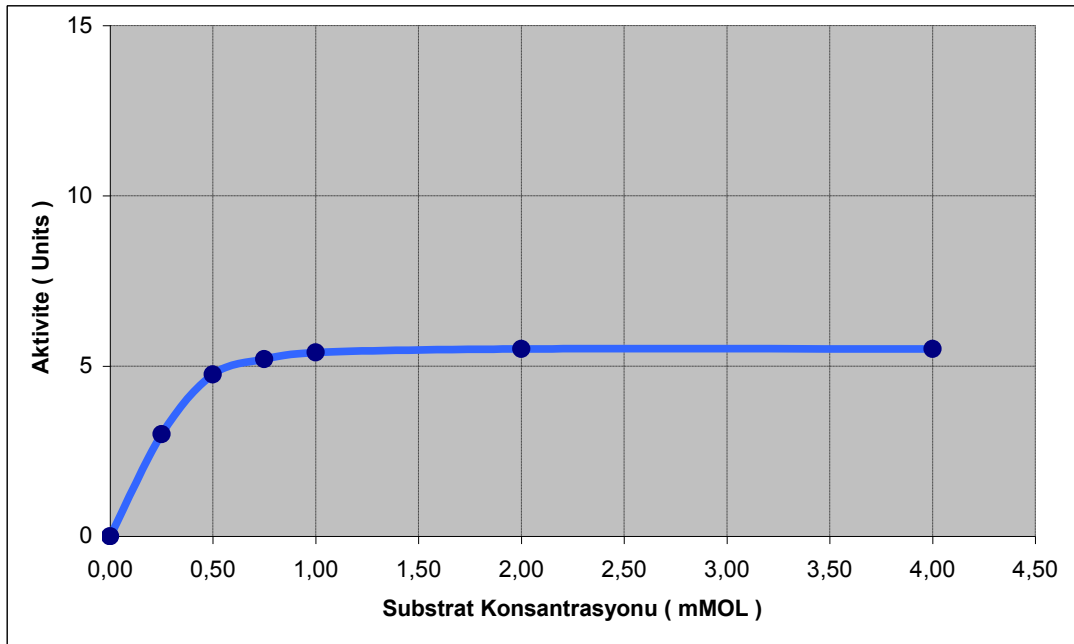
Şekil 2: Uridin ve UMP için Elde Edilen Kromatogram.



#### 4.2.6. HPLC'de Elde Edilen Kromatogramlara Göre Enzim Düzeyinin Hesaplanması

Standart çözelti olan üridinden 0,05 M Tris-buffer kullanılarak pH 7,7 olan 2.5, 5.0, 10, 20 ve 40  $\mu\text{g/ml}$ 'lik çözeltiler elde edilir. Liner regresyon denklemi standart enjeksiyonlara dayalı olan pikler  $\mu\text{g/ml}$ 'den  $\mu\text{mol}$  nükleosid dönüştürmek için kullanıldı.

Enzimin 1 dakikada kullandığı  $\mu\text{M}$  cinsinden substrat miktarı bir ünite enzim değerine ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) eşittir (33,113).



Şekil 3: Nükleotid Substratların Konsantrasyonlarına Karşılık İnternasyonal Ünitelerdeki ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) Nükleosid Formasyonu.

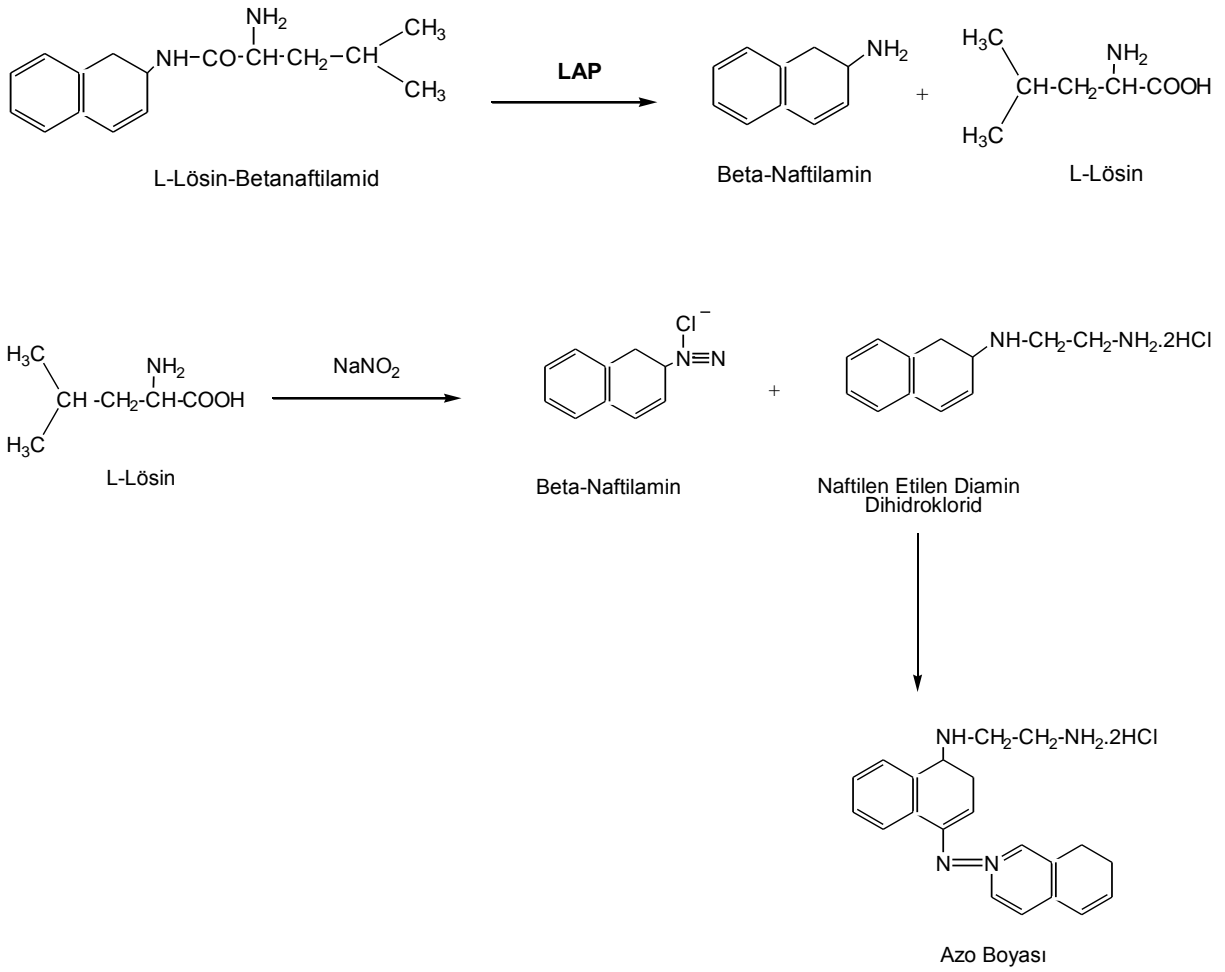
#### 4.3.7. Lösin Aminopeptidaz Ölçümü

Bir deney tüpünde 0,1 ml serum 4,9 ml distile su ile seyreltildi. Daha sonra üç adet deney tüpü alınıp, üzerine kör, numune ve numune yazılarak tüpler işaretlendi. İşlemler sırasıyla aşağıda verilen tablodaki gibi yapıldı.

Tablo 1: LAP Deney sıralaması

KULLANILACAK MADDELER	KÖR	NUMUNE	NUMUNE KÖRÜ
Distile Su	1 ml	-	-
Dilüe Serum (%2'lik)	-	1 ml	1 ml
L-Lösil-Beta-NaftilaminDihidroklorid Çöz. 1 ml	1 ml	1 ml	-
Fosfat Tamponu	-	-	1 ml
Bütün tüpler karıştırıldı, 37 °C'de 2 saat inkübe edildi.			
TCA çözeltisi	1ml	1 ml	1 ml
Tüpler iyice karıştırılıp 5 dakika bekletildi ve 3000 rpm'de 15 dak. Santrifüj edilip, süpernatandan 1'er ml. farklı tüplere aktarıldı.			
Sodyum Nitrit Çözeltisi	1 ml	1 ml	1 ml
İyice karıştırıp 3 dakika bekletildi.			
Amonyum Sülfomat Çözeltisi	1 ml	1 ml	1 ml
Karıştırılıp ve 2 dakika bekletildi.			
N-(1-Naftil)-Etilendiamin Dihidroklorid Çözeltisi	2ml	2 ml	2 ml

Karıştırılıp 10 dakika bekletilen bütün tüpler su körüne karşı optik dansiteleri 560 nm'de okundu. Bütün bu işlemler sonucunda oluşan reaksiyon aşağıdaki gibidir (12).



Şekil 4: LAP Aktivitesinin Reaksiyon Mekanizması (75)

#### **4.3.8. L6sin Aminopeptidaz 6l6m Sonuçlarının Hesaplanması**

K6r ve Numune K6r6 t6plerinin optik dansiteleri toplamı numune t6p6n6n optik dansitesinden çıkarılarak oluşan beta-naftilaminin optik dansitesi bulundu.

LAP 6nitesi, %2'lik kan serumunun 1 ml'si tarafından serbest bırakılan beta-naftilaminin mikrogram cinsinden miktarıdır.

#### **4.3.9. Standart EĞrinin Hazırlanması**

Sonuçların hesaplanması; standart eğri kullanılarak yapıldı. Bunun için daha 6nce hazırladığımız beta-naftilaminin stok 6zeltisi kullanılarak çeşitli dil6syonlarda 6zelti hazırlandı. Bu dil6syonların hazırlanıŐı ve tekab6l ettiği mikrogram karşılığı Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2: Standart Çözeltinin Hazırlanması.

Tüp No	Stok Standart Solisyonu (ml)	Distile Su (ml)	Standart Çözelti ( $\mu\text{g/ml}$ )	B-naftilamin ( $\mu\text{g}$ )
1	6,0	0,0	36	12
2	5,0	1,0	30	10
3	4,0	2,0	24	8,0
4	3,0	3,0	18	6,0
5	2,0	4,0	12	4,0
6	1,0	5,0	6,0	2,0
7	0,5	5,5	3,0	1,0
8	0,0	6,0	0,0	0,0

Hazırlanan standart solüsyonundan 1'er ml tüplere aktarıldı ve 1'er ml fosfat tamponu ile TCA katıldı. Bunlardan da 1 ml başka tüplere aktarıldı. Sonra sodyum nitrit çözeltisinden başlamak üzere serumda uygulanan işlemler aynen takip edildi. Renklendirme işleminden sonra bütün tüplerin reaktif körüne karşı 560 nm'de optik dansiteleri okundu. Bir standart eğri grafiği elde edilerek sonuçlar buna göre değerlendirildi (12).

#### 4.3.10. Çalışmada Kullanılan İstatistik Analiz Yöntemi

Brucellalı ve sağlıklı sığırlara ait verilerin ortalamaları ile veriler arasındaki ilişkinin istatistiki analizleri Student's t test ile yapılmıştır.

## 5. BULGULAR

Hasta ve sağlıklı sığırlardaki enzim aktivitelerindeki değişimler Tablo 4 ve 5'de sunulmuştur.

Serum ALT (U/L), AST (U/L), GGT (U/L), LAP (U/L) ve 5' NT (U/L) aktiviteleri sağlıklı sığırlarda brusellalılara göre önemli düzeyde yüksek ( $p<0.01$ ) tespit edilmiştir ve sonuçlar Tablo 3'de gösterilmiştir.

Sağlıklı 50 sığırlardaki ALT'nin maksimum değeri 68,68 U/L, minimum değeri ise 31,08 U/L, AST'nin maksimum değeri 130,00 U/L, minimum değeri 78,23 U/L, GGT maksimum değeri 17,89 U/L, minimum değeri 9,42 U/L iken, LAP'ın maksimum değeri 25,32 U/L, minimum değeri ise 16,04'dür. 5'NT 'ın maksimum değeri 10,22 U/L, minimum değeri ise 7,73 U/L olarak bulunmuştur.

Tablo 3: Sağlıklı ve Brusellalı Sığırların Enzim Aktivitelerinin İstatistiksel Değerleri

<b>Enzim aktiviteleri</b>	<b>Brusellalı Sığır Serumu (n=50)</b> <b>x±Sx</b>	<b>Sağlıklı Sığır Serumu (n=50)</b> <b>x±Sx</b>	<b>P</b>
<b>ALT (U/L)</b>	137,84 ± 21,98	48,44 ± 11,57	0.01
<b>AST (U/L)</b>	196,23 ± 36,37	102,51 ± 18,31	0.01
<b>GGT (U/L)</b>	60,85 ± 14,27	12,47 ± 02,56	0.01
<b>LAP (U/L)</b>	66,54 ± 08,89	18,89 ± 02,58	0.01
<b>5' NT (U/L)</b>	25,13 ± 02,88	5,32 ± 01,98	0.01

Tablo 4: Sağlıklı Sığırlarda Enzim Profili.

	<b>Minumum Değer</b>	<b>Maksimum Değer</b>	<b>Ortalama Değer</b>	<b>Std. Sapma</b>
<b>ALT (U/L)</b>	31,08	68,68	48,44	11,57
<b>AST (U/L)</b>	78,23	130,00	102,51	18,31
<b>GGT (U/L)</b>	9,42	17,89	12,47	2,56
<b>LAP (U/L)</b>	16,04	25,32	18,89	2,58
<b>5' NT (U/L)</b>	7,73	10,22	5,32	1,98

Brucellalı sığırların ALT, AST, GGT, LAP ve 5'NT ortalamaları ise sırasıyla; 137,84 U/L, 196,23 U/L, 60,85 U/L, 66,54 U/L ve 25,13 U/L olarak bulunmuştur.

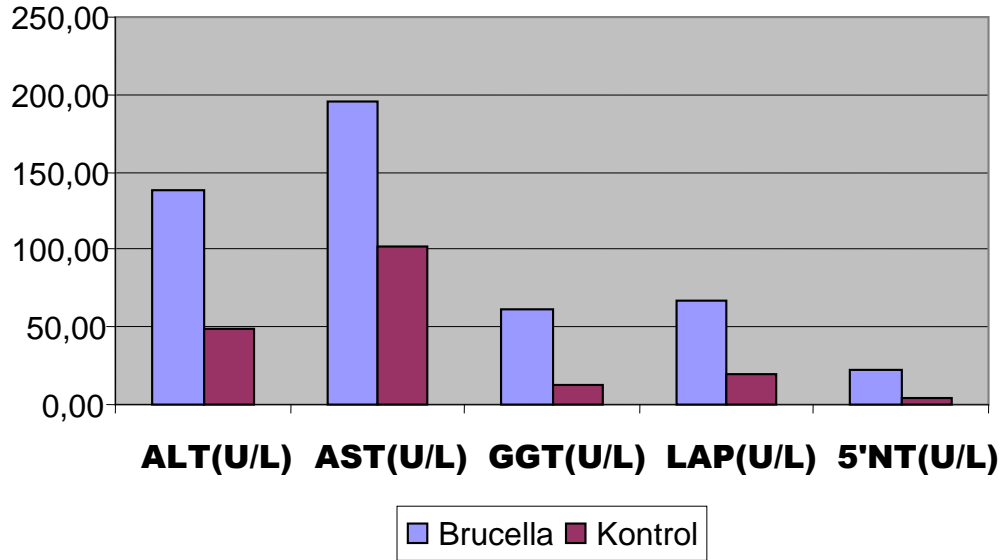
Hasta grubun enzim değerlerindeki en yüksek ve en düşük değerler sıralandığında; ALT için maksimum değer 197,97 U/L iken minumum değer 116,63 U/L'dir. AST'nin maksimum değer 263,08 U/L, minumum değer, 153,05 U/L, GGT'nin maksimum değer 92,36 U/L, minimum değer 41,21 U/L'dir. LAP'ın maksimum değer 89,89 U/L minumum değer 55,61 U/L, 5'NT'nin maksimum değer 30,65 U/L iken, minimum değer ise 20,04 U/L bulunmuştur.



Tablo 5: Brucellalı Sığırlarda Enzim Profili.

	Minumum Değer	Maksimum Değer	Ortalama Değer	Std. Sapma
<b>ALT ( U/L)</b>	116,63	197,97	137,84	21,98
<b>AST (U/L)</b>	153,05	263,08	196,23	36,37
<b>GGT (U/L)</b>	41,21	92,36	60,85	14,27
<b>LAP (U/L)</b>	55,61	89,89	66,54	8,89
<b>5' NT (U/L)</b>	20,04	30,65	25,13	2,88

Sağlıklı ve brucellalı sığırların enzim aktiviteleri Şekil 5'de, kontrol grubu ve brucellalı grup şeklinde kendi aralarında karşılaştırılmıştır.



Şekil 5: Sağlıklı ve Brucellalı Sığırların Serum ALT, AST, GGT, LAP ve 5'NT Aktivitelerine İlişkin Bulguların Karşılaştırılması.

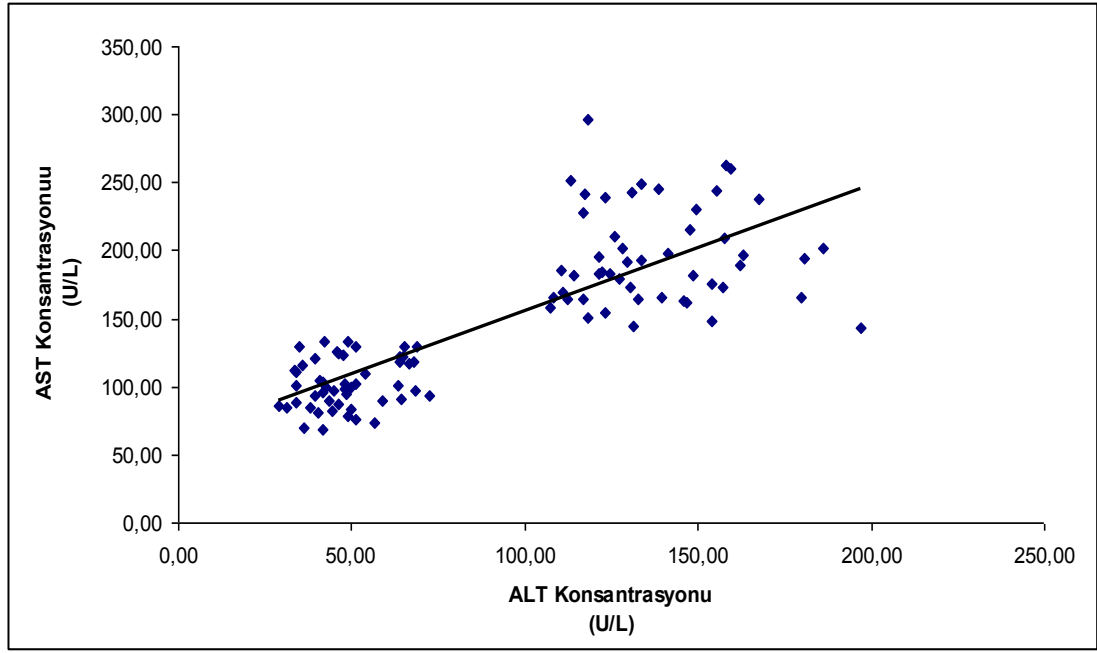
Kontrol (sağlıklı) grubunun serum ALT, AST, GGT, LAP ve 5'NT aktivitelerinin ortalama değerleri ile hasta (brucellalı) gruptaki aynı enzim aktivitelerinin ortalama değerleri karşılaştırıldığında,  $p < 0,01$  düzeyinde önemli olduğu görülmüştür. Bu enzimler arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Bulgular arasında bulunan pozitif korelasyon ve istatistiksel önemleri Tablo 6'da verilmiş ve her bir enzimin kendi aralarındaki korelasyon bağları arka sayfalarda grafiksel olarak gösterilmiştir.

	ALT(U/L)	AST(U/L)	GGT(U/L)	LAP(U/L)
AST(U/L)	0,808* 0,000**			
GGT(U/L)	0,854* 0,000**	0,801* 0,000**		
LAP(U/L)	0,883* 0,000**	0,824* 0,000**	0,879* 0,000**	
5'NT(U/L)	0,901* 0,000**	0,796* 0,000**	0,901* 0,000**	0,958* 0,000**

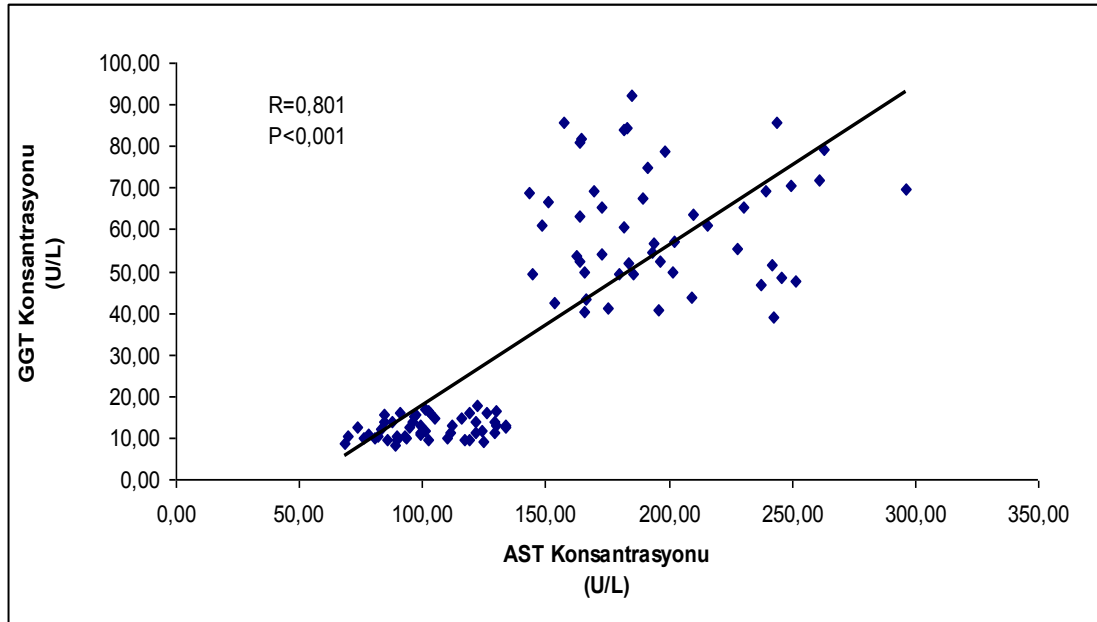
\* korelasyon

\*\*P-değeri

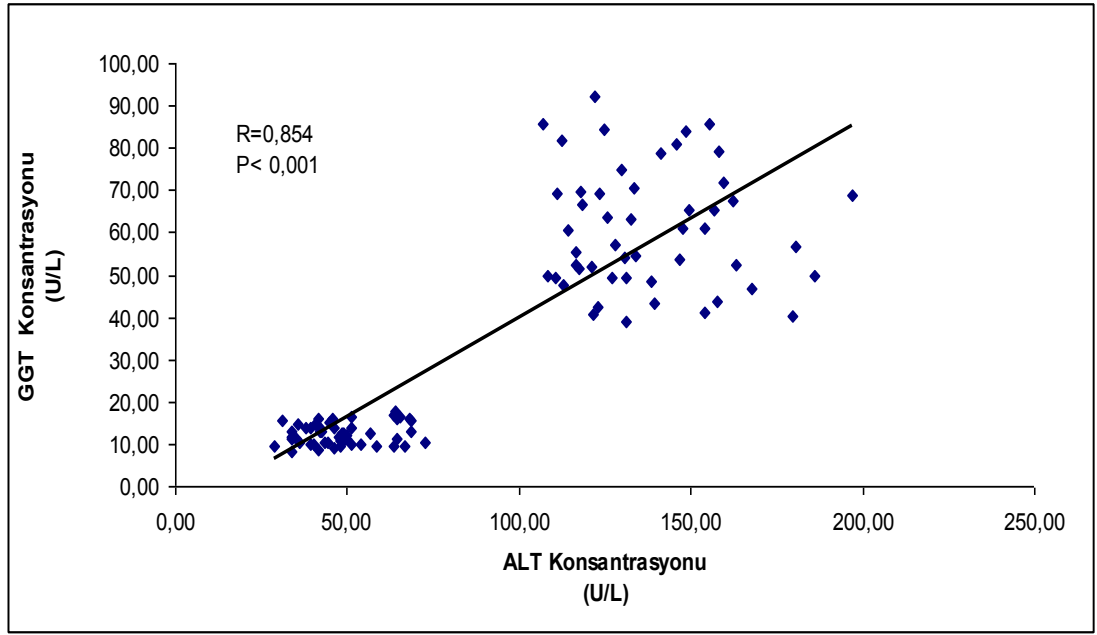
Tablo 6 : Enzimlerin istatistiksel önemleri ve korelasyon karşılaştırmaları



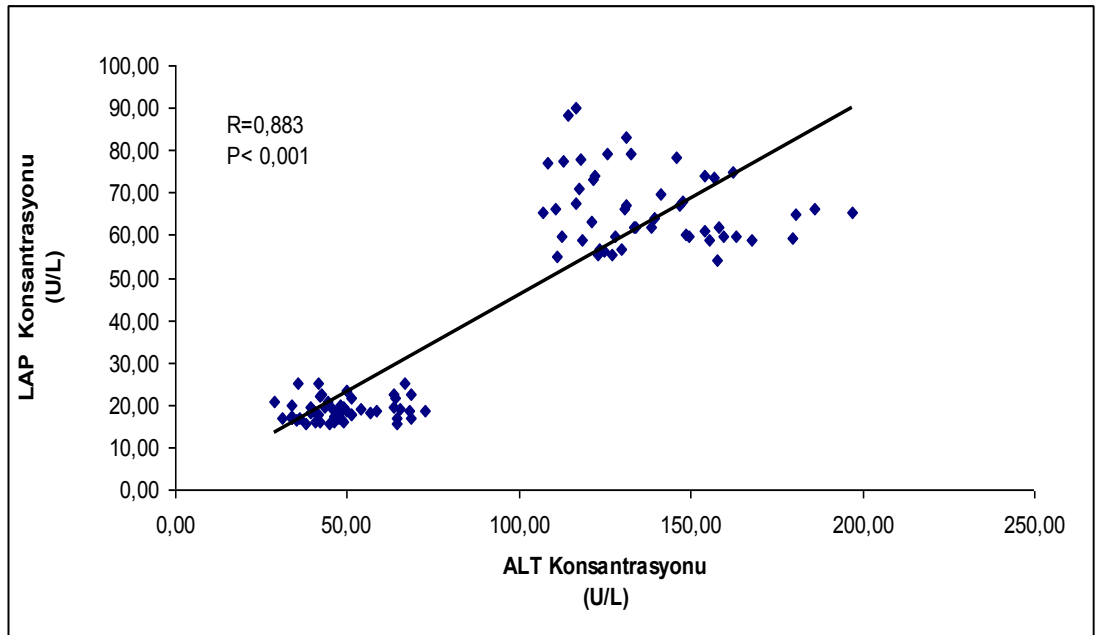
Şekil 6: AST ve ALT konantrasyonları karşılaştırma grafiği



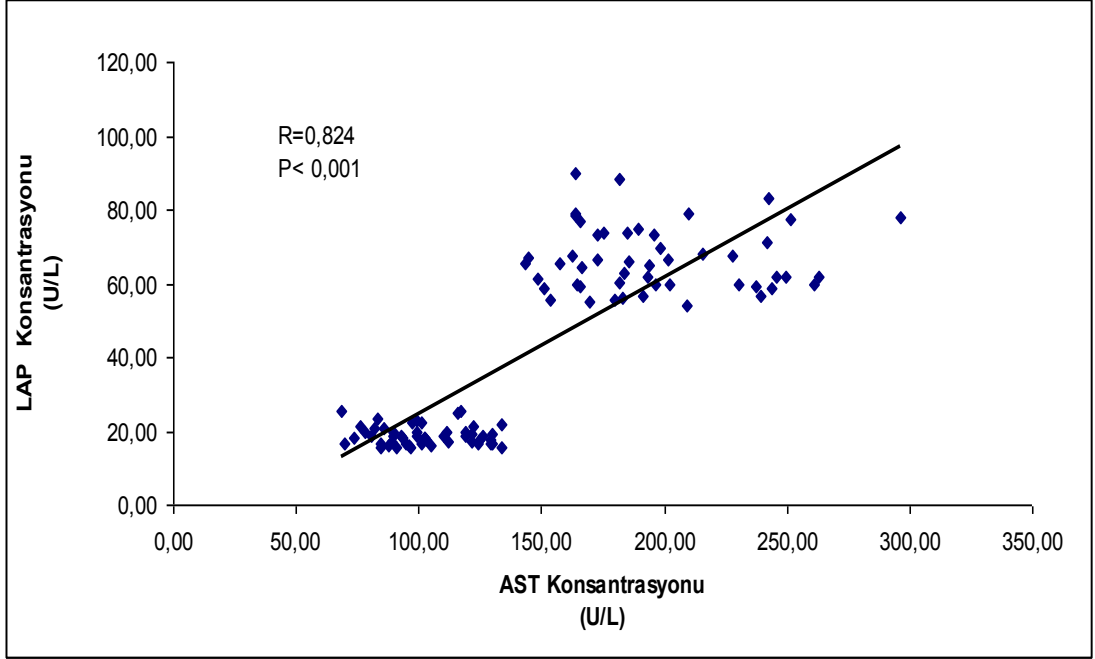
Şekil 7: GGT ve AST konantrasyonları karşılaştırma grafiği



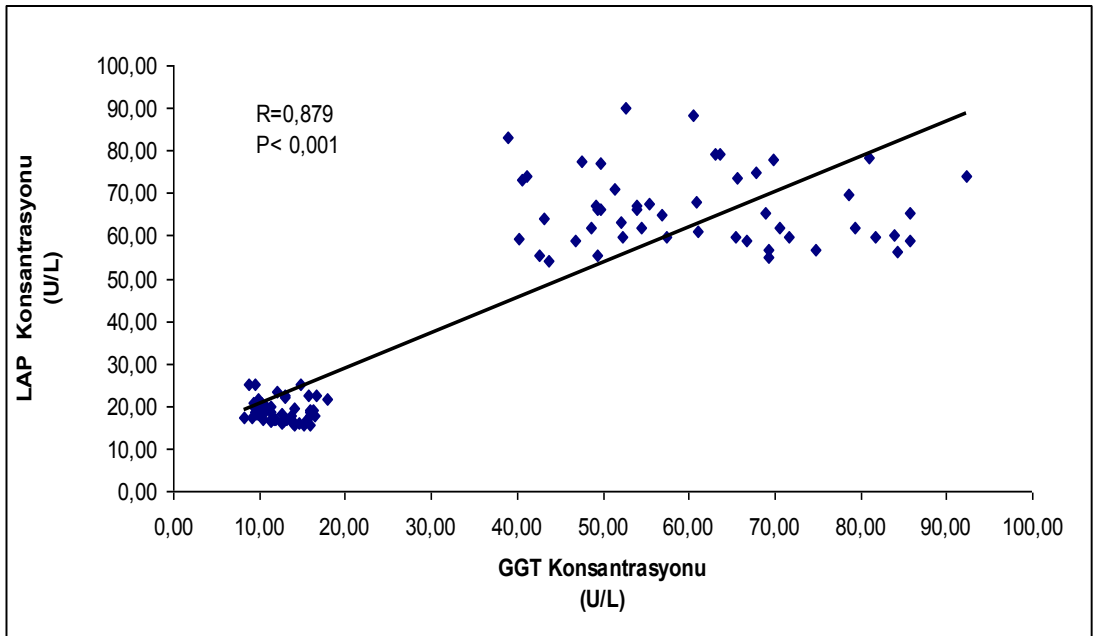
Şekil 8: GGT ve ALT konsantrasyonları karşılaştırma grafiği



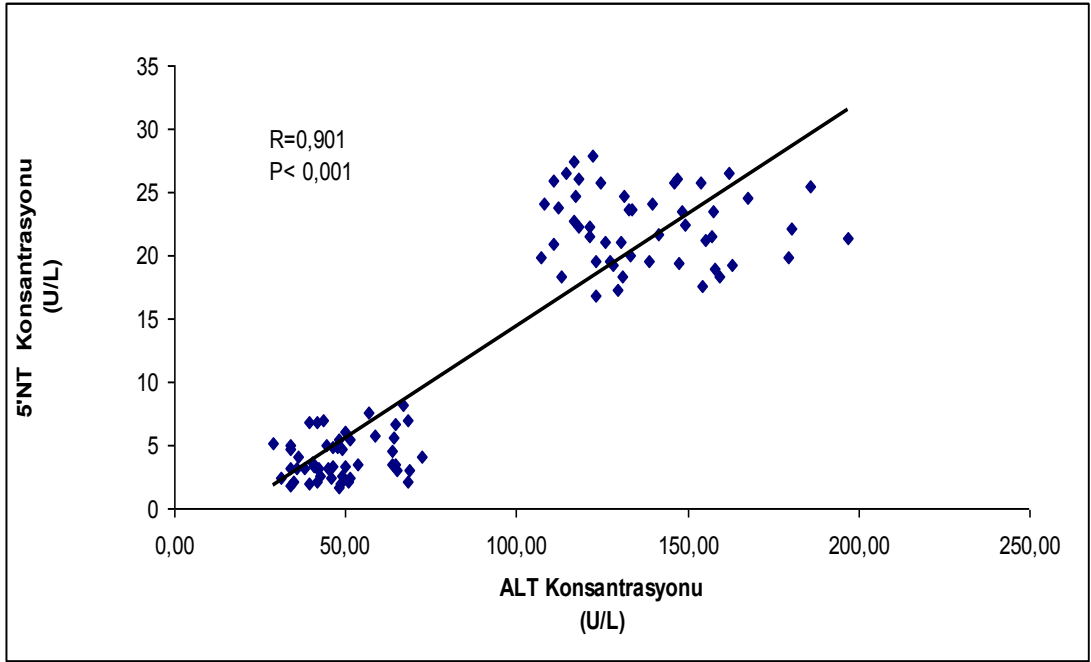
Şekil 9: LAP ve ALT konsantrasyonları karşılaştırma grafiği



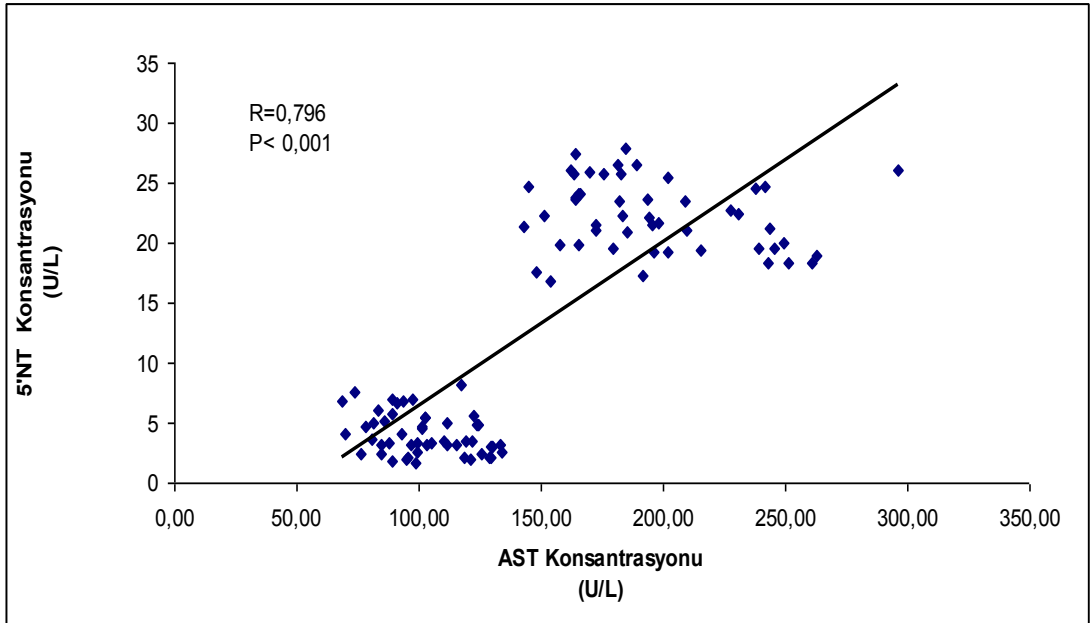
Şekil 10: LAP ve AST konsantrasyonları karşılaştırma grafiği



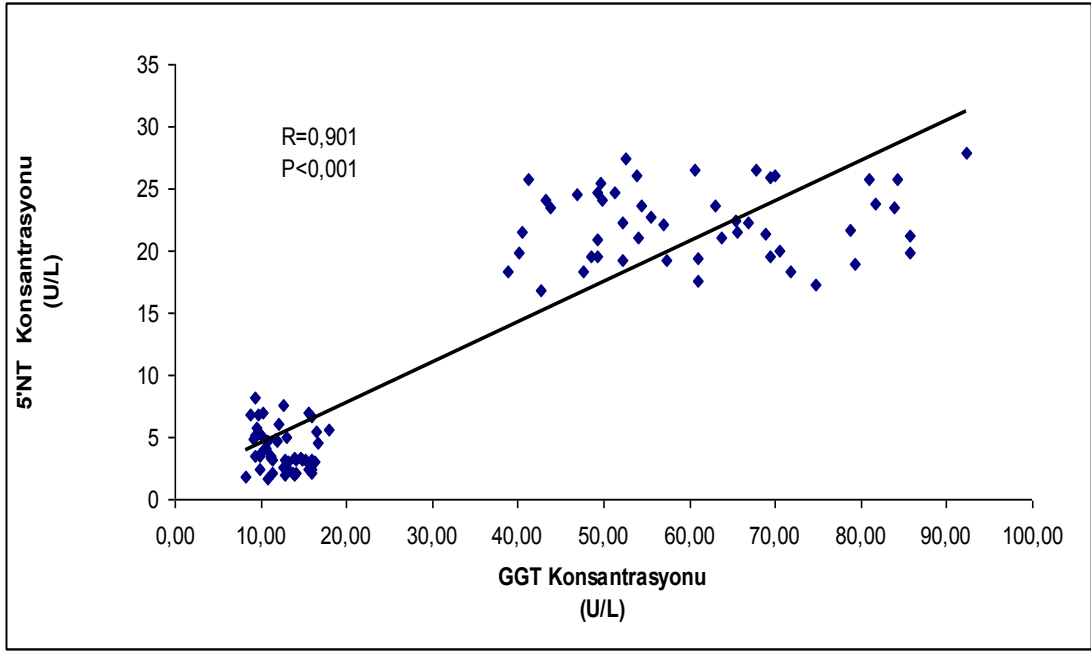
Şekil 11: LAP ve GGT konsantrasyonları karşılaştırma grafiği



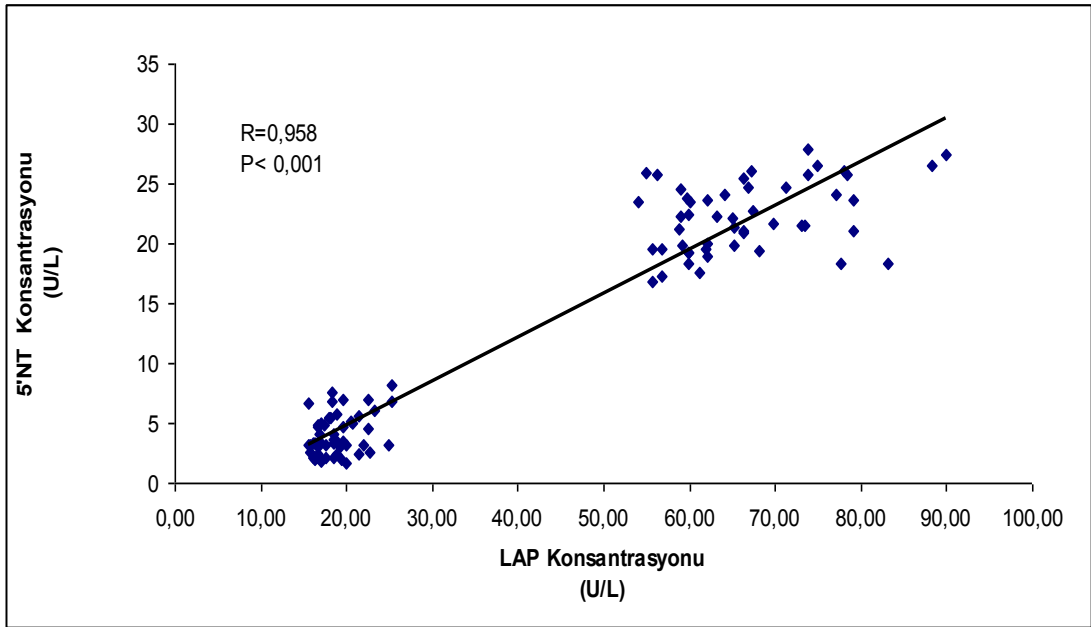
Şekil 12: 5'NT ve ALT konsantrasyonları karşılaştırma grafiği



Şekil 13: 5'NT ve AST konsantrasyonları karşılaştırma grafiği



Şekil 14: 5'NT ve GGT konsantrasyonları karşılaştırma grafiği



Şekil 15: 5'NT ve LAP konsantrasyonları karşılaştırma grafiği

## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda hayvancılık maksimum düzeyde yumurta, süt ve et üretimi üzerine yoğunlaşmıştır. Artık tüketicisi de aldığı gıdanın güvenliği ve hayvan sağlığı ile önemli lde ilgilenmeye başlamıştır. Hayvan yetiştiriciliğinde, hastalıklar ve stres faktörleri, hayvan sağlığı ile ürünün kalitesinde büyük bir etkiye sahiptir.

Brusella, sığır tüberkülozu ve kuduzla beraber dünyanın en önemli zoonozlarından (122). Brusella enfeksiyonu, Akdeniz lkelerinde çiftlik hayvanları ve insanlarda endemik seyretmektedir. Her yıl yaklaşık yarım milyon insanda brucella vakaları görülmektedir. Hayvanlarda enfeksiyonun yaygınlığı o bölgede bulunan insanlarda enfeksiyon riskine anahtar bir etmendir. B.abortus ve B.suis genellikle meslek gruplarını etkilemektedir (41,108). Asya, Alt Sahra Afrikası ve Latin Amerika lkelerinde de sık görülmektedir. Brucella kırsal bölgelerde ve özellikle ekonomik gelirin büyük lde hayvancılık ve süt ürünlerine bağlı olduğu ülkelerde, geniş sosyo-ekonomik etkilerinin yanı sıra insan ve hayvan sağlığına da büyük etkisinin var olduğu bildirilmektedir (41,101,122).

Karaciğer retikuloendotelial sistemin en büyük organıdır. Ruminantlar ise karaciğer hastalıklarına yatkındır. Çünkü karaciğeri metabolizmadaki merkezi rolünden dolayı enfeksiyon ve parazitik hastalıklar da dahil olmak üzere bir çok metabolik bozukluklarla ilişkilidir (137). Brucella vücutta bir çok organ ve sisteme bulaşabilen sistemik bir enfeksiyon olmasından dolayı karaciğer ile sık sık ilişkilendirilir. Akut ve kronik brucellanın her ikisinde de hastalığın karaciğere yerleşmesi yaygındır. Genellikle transaminaz düzeylerinde hafif bir artış ve orta derecede hepatosplenomegali oluşur,



bazen akut hepatit gelişiyor olmasına rağmen enfeksiyonun kendine has klinik belirtileri çok nadir gözlenebilir (1).

Karaciğer hastalıkları daima kendini aminotransferazın artışı ile göstermemektedir. Enzim seviyeleri kompanze sirozlularda veya kronik ve tam olmayan obstrüksiyonu olanlarda normal olabilmektedir. Bir çok araştırıcı AST-ALT oranını kullanarak hastalıkların ayırıcı tanısına gitmeye çalışmıştır. Genel olarak ALT aktivitesi, AST aktivitesini toksik ve viral hepatitlerde kronik aktif hepatitte ve kolestatik hepatitte aşmaktadır. AST'nin ALT'ye göre yüksek olduğu bu durumlar ise alkolik, neoplastik veya infiltratif karaciğer hastalığı ve non-biliyer sirozdur. AST'nin ALT'ye oranı alkolik hepatit ve/veya sirozda 2'nin üzerindedir ve bu durum ekstrahepatik obstrüksiyon, viral hepatit gibi bu oranın 2'den az olduğu durumlarda hastalığın ayırıcı teşhisinde faydalı bilgiler vermektedir (141).

Organizmadaki ALT, AST ve GGT aktivitelerindeki artışları, fizyolojik durum, ırk, yaş, beslenme durumu, hastalıklar ve stres gibi bir çok faktörün etkilediği bildirilmektedir (128).

Hem ALT hem de AST hasarlı hücrelerden hücre membranındaki permeabilite artışına veya hücre nekrozuna bağlı olarak salınım gösterir. Bu durumda ALT veya AST düzeyleri serumdaki yüksek değerlere yol amaktadır. Enjekte edilen aminotransferazlar plazmada olduğu gibi interstisyel sıvı içinde de dağılırlar ve buradan diğer serum proteinleri gibi azar azar yıkımlanırlar ve AST, ALT düzeyinden daha hızlı normal değerlere ulaşırlar. Muhtemelen de RES'deki hücreler tarafından katabolize edilmektedir. Hepatik sinüsoidal hücreler, AST klirensi için major yapılarıdır. Aminotransferazlar idrarda bulunmaz ve safrada da çok küçük miktarlarda bulunurlar. Bu nedenle de ALT ve AST'nin klirensinde biliyer ve üriner atılımın rolü yok kabul edilir. Mitokondriyel AST enziminin salınımı için sitoplazmik AST izoenziminin veya ALT enziminin salınmasına göre daha şiddetli hücre hasarı gerekmektedir. Bu nedenle mitokondriyal/sitoplazmik

AST oranı veya mitokondriyal/total AST oranının özellikle şiddetli hücre nekrozu ve alkolik karaciğer hastalığı için tanısal olduğu öne sürülmektedir (141).

Bu çalışmada; brucellalı sığırların serumlarında AST, ALT, GGT, 5'NT ve LAP aktiviteleri ve brucellanın sığır karaciğerine verdiği hasarı bu enzimlerin yardımıyla ortaya koyarak, enzimler arası korelasyonun belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Yapılan taramalarda, brucellalı hayvanlarda enzim aktivitelerinin araştırıldığı kaynağın fazla olmadığı görülmüştür. Mevcut çalışmalar da genellikle brucella konusunda mikrobiyolojik ve patolojik çalışmaları kapsamaktadır.

AST, ALT, GGT aktivitelerinin sığır serumlarında dağılımı ise bir çok araştırmacı tarafından incelenmiştir (25, 68, 115, 117, 118, 119,128, 131, 135, 137). LAP ve 5'NT aktiviteleri ile ilgili kaynak sayısının çok olmadığı görülmüştür.

Çalışmamızda, klinik olarak sağlıklı ve brucellalı sığırlarda serum ALT, AST, GGT, LAP ve 5'NT aktiviteleri incelenmiştir. Sağlıklı sığırlarda ALT;  $48,44 \pm 11,57$  U/L, AST;  $102,51 \pm 18,31$  U/L, GGT;  $12,47 \pm 2,56$  U/L, LAP;  $18,89 \pm 2,58$  U/L, 5'NT;  $5,32 \pm 1,98$  U/L bulunmuştur.

Boonprong ve ark. (21) yaptıkları çalışmada sağlıklı sığırlarda AST aktivitesini  $68,6 \pm 2,4$  U/L, ALT  $30,5 \pm 33,7$  U/L, GGT aktivitesini ise  $14,5 \pm 0,7$  U/L olarak bulmuşlardır.

Kaneko (70) sığırlarda; ALT düzeyini  $27 \pm 14$  U/L, AST  $105 \pm 27$  U/L ve GGT değerini ise  $15,7 \pm 4,0$  U/L olarak rapor etmiştir.

Aydın (10) yaptığı çalışmada, AST aktivitesini kış aylarında sağlıklı sığır serumunda  $89,96$  IU/L, hasta da ise  $118,72$  IU/L olarak, Jovanovic ve

ark. (69) karaciğer bozukluğu olan doğum yapmış ineklerde AST aktivitesinde % 56 artış görüldüğünü bildirmişlerdir.

Charles ve ark., (30) sığırlarda AST aktivitesini normal serumda  $56 \pm 14$  IU/L bulmuşlardır. Sevindik (120) AST aktivitesini mandalarda  $113,93 \pm 12,57$  IU/L, Holsitein ırkında  $59,93 \pm 6,03$  IU/L, Yerli Kara'da  $66,45 \pm 8,42$  IU/L olduğunu bildirmiştir. Yerli Kara ırkında AST aktivitesini normal serumda Otto ve ark. (100)  $55,7 \pm 13,4$  IU/L, Bogin ve ark. (18)  $70 \pm 11$ , Blood ve ark. (17)  $60 - 150$  IU/L, Fraser (44)  $45 - 110$  IU/L, Turgut (131)  $78 - 132$  IU/L olarak açıklamışlardır.

Sevindik (120) normal serumda ALT aktivitesini mandalarda  $33,8 \pm 4,4$  IU/L, Holstein ırkı ineklerde  $19,07 \pm 2,20$  UI/L, Yerli Kara ırkı sığırlarda  $23,35 \pm 3,31$  IU/L, Otto ve ark. (100)  $15,4 \pm 6,1$  IU/L, Fraser (44)  $6,9 \pm 35,3$  IU/L (20), Turgut (131)  $14 - 38$  IU/L olarak belirtmişlerdir.

Erdem ve ark. (41) insanda brucella vakasında, serum ALT 370 U/L, serum AST 582 U/L, serum ALP 1073 U/L, GGT 296 U/L olarak rapor etmişlerdir.

Hossain ve ark. (61) eritrosit 5'NT aktivitesini insan, köpek, kedi ve sığırlarda çalışmışlardır. Ayrıca Fini ve ark.(43) boğaların seminal plazmalarında 5' NT multipleri hakkında çalışma yapmışlardır.

Eichel (40) ise, sığır sütünde LAP aktivitesini tayin etmiş, çalışmasında inek sütündeki LAP aktivitesini  $4 - 150$  U/L, serum aktivitesini de  $5 - 37$  U/L olarak bulmuştur.

Öğün (102) koyunlarda yaptığı araştırmada, Tuj ırkı koyunlarda LAP serum aktivitesini  $8,36 \pm 1,82$  µg/ml, Morkaraman ırkı koyunlarda ise  $8,93 \pm 3,55$  µg/ml olarak bulmuştur.

Kontrol grubumuz olan sağlıklı sığırlardaki AST değerleri Blood (17), Fraser (44), Turgut (131), Aydın (10), Sevindik ve ark. (120) tarafından yapılan çalışmalarla uyum gösterirken, Charles (30), Bogin ve ark (18), Boonprong (21) ve Otto'nun (100) tespit ettiği değerlerden daha yüksek olmasına rağmen sonuçlar fizyolojik sınırlar içerisinde.

Çalışmamızda sağlıklı sığırlardaki ALT değerleri ise, Fraser (44), Turgut (131), Kaneko (70), Boonprong (21) ve Sevindik ve ark. (120) tarafından yapılan çalışmalarda bulgularla uyum gösterirken, Otto (100) tarafından tespit edilen değerlerden yüksek çıkmıştır.

Tespit ettiğimiz sağlıklı sığırlardaki GGT aktiviteleri ise Kaneko (70) ve Boonprong'un (21) belirttiği değerlerle uyum içerisinde. Araştırmacıların verdiği değerler ile yaptığımız bu çalışmadaki kontrol grubunun sonuçları benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda bulunan LAP kontrol değerleri Eichel'in (40) bildirdiği değerle uyum göstermektedir. LAP sonuçlarımızı karşılaştıracığımız daha fazla bilgiye ve 5'NT'ı karşılaştıracığımız herhangi bir literatür bilgisine rastlanmamıştır.

Grünwaldt ve ark (53), et üretkenliği olumsuz yönde etkileyen faktörleri belirlemek için süt veren, gebe olmayan ve genç danalardan oluşan 120 adet sığırda, yaptıkları çalışmada, AST, ALT ve LDH değerlerini referans aralıklarının altında, ALP değerlerini ise sığırların %2'sinde referans aralığının üzerinde bulmuşlardır.

Diğer çalışmalar gebelikle birlikte AST ve ALT düzeylerinin arttığını (66), daha sonra düştüğü (8,119) belirtilirken, diğer bir çalışmada (128) AST ve ALT düzeylerinin doğum sonrasında doğum öncesine göre arttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar (16, 78) AST ve ALT düzeylerinde önemli bir değişikliğin olmadığını, bazıları (135) ise bu

çalışmadakinin aksine AST ve ALT düzeylerinin doğum öncesine göre, doğum sonrasında azaldığını bildirmektedirler.

Yıldız ve ark. (137), ineklerde gebelik sürecinde ve erken postpartum döneminde yaptıkları çalışmada, doğum öncesine göre doğum sonrası AST, ALT ve LDH düzeylerinde önemsiz, CK düzeyinde önemli artışlar olduğunu belirlemişlerdir.

Serum GGT aktivitesinin kolestazis ile artışı bilinmektedir. Köpeklerde ve kedilerde kolestazisi tespit etmede GGT'nin ALP üstünde bir avantajı yoktur. Ancak GGT karaciğer spesifiktir. Serum GGT aktivitesi at, sığır, koyun ve domuzlarda kolestatik hastalıklarda artış göstermektedir. Bu türlerde dar referans değerleri nedeniyle GGT, ALP'den daha çok kullanışlıdır. Serum GGT aktivitesinin akut hepatik nekrozu olan at, sığır ve koyunlarda artabileceği bir çok çalışmada rapor edilmiştir (116).

Serum ALT aktivitesi hepatoselüler permabilitedeki değişikliklerle artar. Bu artış miktarı akut hastalıkta etkilenen hücrelerin sayısı ile paralellik gösterir. Serum ALT aktivitesindeki artış, hepatositlerdeki enzim indüksiyonu sebebiyle olabilir. Glukokorkoidler, glukojenik aktivitenin sonucu, hepatik ALT'nin yükselmesine sebep olur (39).

Yapılan başka bir çalışma, GGT, 5'NT ve LAP aktivitelerinin, sığırlarda intra ve ekstra hepatik kolestazizde artabileceğini ayrıca GGT'nin safra kanalı hasarıyla açığa çıkabileceğini göstermektedir (137). 5'NT'in ise ruminantlarda kolestaziste plazma içine sızdığı ve bu durumun ilerlemiş karaciğer lezyonlarında değişebildiği bildirilmiştir (53).

Karaciğer hastalıkları teşhisinde GGT'nin duyarlılığı yüksek ancak spesifitesi düşüktür. Çünkü primer bir karaciğer hastalığı olmayan durumlarda da muhtemelen hafif düzeyde GGT seviyeleri yükselmektedir. GGT'nin klinik uygulamada en sık kullanım alanı; alkalen fosfatazın yüksek

saptandığı hastalarda GGT'nin kemik hastalıklarında yükselmemesi nedeni ile kemik ve karaciğer hastalığının ayırımında yardımcı olarak kullanılmasıdır. GGT değerinin 10-20 kat gibi çok yüksek değerleri intrahepatik biliyer tıkanıklıklarda veya primer veyasekonder hepatik malignitelerde görülebilmektedir. Bazı araştırmacılar GGT artışının alkalen fosfataz, lösin aminopeptidaz artışına göre daha sensitif olduğunu bildirmekle beraber GGT, alkalen fosfataz ve 5'nükleotidaz yükseklikleri etkili bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (141).

GGT aktivitesinin özellikle karaciğer lezyonlarında (hepatik apseler) arttığı görülmüştür. Hepatik apselerde GGT aktivitesi genç danalarda lezyonların akut olmasından dolayı daha yüksek bulunmuştur. Ancak ölüm sonrası yapılan patolojik incelemeler, yetişkinlerdeki lezyonların çok daha kronik olduğunu göstermiştir. GGT, 5'NT ve LAP aktiviteleri karşılaştırıldığında; GGT ve 5'NT'nin benzer spesifisiteye sahip olduğu görülmüştür. Fakat çeşitli karaciğer lezyonlarında hastalık esnasında GGT'nin, 5'NT'den daha yüksek ve daha kararlı olduğu ileri sürülmüştür (116).

Yine aynı çalışmada 5'NT, GGT ve LAP benzer spesifiteye sahip bulunmuş fakat GGT'nin kronik karaciğer hasarında daha belirgin olduğu görülmüştür. Özellikle 5'NT'nin geniş çaptaki yayılımı göz önüne alındığında, ölçümünün GGT'ye kıyasla daha az avantajlı olduğu söylenebilir. LAP ise dokulara geçer fakat plazmaya yavaşça sızarak karaciğerdeki aktivitesi azalmaktadır. Serumdaki GGT seviyeleri birçok karaciğer hastalığında yükselebilmektedir ve bu nedenle ayırıcı tanıda değeri sınırlı kalmaktadır. Hepatobiliyer hastalıkların % 90'ında GGT seviyeleri yüksek bulunmaktadır (116).

Çalışmamızda, Brucellalı sığırların serumunda enzim düzeyleri ise: ALT;  $137,84 \pm 21,98$  U/L, AST;  $196,23 \pm 36,37$  U/L, GGT;  $60,85 \pm 14,27$  U/L, LAP;  $66,54 \pm 8,89$  U/L, 5'NT;  $25,13 \pm 2,88$  U/L olarak bulunmuştur. Brucellalı

sığırlarda bulduğumuz bu değerleri karşılaştıracağımız bir literatürün bulunamaması nedeniyle sonuçlar tartışılmamıştır.

Araştırmamız sonucunda sığır serumlarında incelenen enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde, brucellalı ve sağlıklı sığırların enzim aktiviteleri arasında fark olduğu görülmektedir. Bulgular arasındaki bu farkın nedenini şöyle açıklayabiliriz: ALT, AST, ALP, GGT enzimleri hayvanlarda sağlık göstergesidir. Kalp, iskelet, karaciğer ve kaslardaki doku veya hücrelerdeki hasarı açığa çıkarırlar. Enzimlerin tümü çoğunlukla intrasellüler etkiye sahiptir. Bu yüzden normal şartlar altında serum enzim aktivitesi çok düşüktür veya hiç yoktur. Aktivitelerindeki herhangi bir artış buldukları dokulardaki hasarı gösterir.

Aminotransferazlar hücre içi ortamlarda sentezlenirler ve hücre membranının geçirgenliğinin değişimi veya hücrenin parçalanması sonucunda kana geçerek böylece serumda yüksek konsantrasyonlarda saptanırlar. Br. abortus'un organizmada lenf düğümlerine, uterus ve meme gibi organlara yerleştiği bilinmektedir. Brucellalı sığır serumlarındaki enzimlerin yüksek aktivitelerine karaciğerdeki patolojik değişimin neden olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmada, sağlıklı sığırlardan elde edilen ALT, AST ve GGT ortalama değerleri, literatürlerde belirtilen sınırlarla uyum göstermektedir. Çalışmamızda sağlıklı ve brucellalı sığırlardaki enzim artışları istatistiki yönden  $p < 0,01$  düzeyinde anlamlı ve enzimler arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.

Bu araştırmada; yapılan literatür taramalarında konu ile ilgili yeterli sayıda kaynağa ulaşılamadığı için bulgular yeterince tartışılmamıştır. Brucella insidansının her sürüde farklı olması, çeşitli bulaşma olanaklarının oluşu ve özellikle latent enfekte hayvanların tespit edilmesindeki pratik zorluklar sebebiyle; brucellalı ve sağlıklı sığırlarda ALT, AST, GGT, LAP ve

5'NT aktivitelerinin tespit edilmesinin enfekte hayvanlardaki karaciğer hasarının tesbitinde ve bu sonuçların bundan sonra daha kapsamlı çalışmalar yapılarak klinik bulgularla birlikte ilişkilendirilip değerlendirilmesi açısından araştırmacılara yardımcı olacağı kanısındayız. Ayrıca, sığırlarda 5'NT ve LAP aktivitelerinde bazal değerlerin belirlenmesi yönünden çalışmamız bu konuda literatür taramalarına faydalı olacağına inanıyoruz.



## 7. ÖZET

Bu çalışmada; 50 sağlıklı ve 50 Brucellozisli sığırdan ALT, AST, GGT, 5'NT ve LAP serum aktivitelerini belirlemek amacıyla yapıldı.

Sağlıklı ve hasta gruplardan kan alınarak, serumlar çıkarıldı. Serumlar taze iken ALT, AST ve GGT değerleri ticari kitlerle kolorimetrik yöntemle ölçüldü. -20 °C'de saklanan serumlarda ise, kolorimetrik yöntemle LAP, Sakai ve ark. yöntemiyle HPLC kullanılarak 5'NT tayin edildi. İstatiki analizler için Student's t test kullanılmıştır.

Klinik olarak sağlıklı 50 sığırdan oluşan ilk grupta ALT; 48,44±11,57 U/L, AST; 102,51±18,31 U/L, GGT; 12,47±2,56U/L, LAP; 18,89±2,58 U/L, 5'NT; 5,32±1,98 U/L olarak ölçüldü. Bununla beraber Brucellozisli 50 hasta sığırdan oluşan ikinci grupta ölçümler ALT; 137,84±21,98 U/L, AST; 196,23±36,37 U/L, GGT; 60,85±14,27U/L, LAP; 66,54±8,89 U/L, 5'NT; 25,13±2,88 U/L olarak bulunmuştur.

Brucellalı sığırlar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiki yönden ( $p<0,01$ ) önemli olduğu görülmüştür.

## 8. SUMMARY

In this study, 50 healthy and 50 diseased cattle with Brucellosis were searched to identify serum ALT, AST, GGT, 5'NT and LAP enzyme activities.

Blood samples were taken from both groups and fresh serum extracted from blood samples were used to measure ALT, AST and GGT enzyme activities through spectrophotometric method by using commercial laboratory assays. Serum samples maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  were used for determination of LAP enzyme activity through spectrophotometric method and also for determination of 5'NT enzyme activity through the method specified by Sakai et al. by using HPLC. Student's t test was used for statistical analysis.

In the first group of 50 clinically healthy cattle, ALT, AST, GGT, LAP and 5'NT serum activity levels were measured as  $44\pm 11,57$  U/L, AST;  $102,51\pm 18,31$  U/L, GGT;  $12,47\pm 2,56$ U/L, LAP;  $18,89\pm 2,58$  U/L, 5'NT;  $5,32\pm 1,98$  U/L. However measurements found in the second group of 50 cattle diseased with Brucellosis were ALT;  $137,84\pm 21,98$  U/L, AST;  $196,23\pm 36,37$  U/L, GGT;  $60,85\pm 14,27$ U/L, LAP;  $66,54\pm 8,89$  U/L, 5'NT;  $25,13\pm 2,88$  U/L.

Comparing the measurements of the first healthy group with that of the second diseased group, revealed that the differences were statistically significant ( $p < 0,01$ ).

## 9. KAYNAKLAR

- 1- Akıncı, H. Bodur, M. Çevik, A. Erbay, S. Eren, Z raman, N. Balaban, A. Atan, G. Ergül A complication of brucellosis: Epididymoorchitis. International Journal of Infectious Diseases, 10; 2, 171-177, 2006.
- 2- Amador, E., Wacker, W. B., Enzymatic Methods Used for Diagnosis, Methods of Biochemical Analysis, Vol 13, 265-306, 1965
- 3- Amici, A., Magni, G., Human Erythrocyte pyrimidine 5'Nucleotidase, PN-1., Arch. Biochem. Biophys.,397:184-190,2002
- 4- Amici, A., Emanuelli, M., Rafaelli, S., Saccuci, F., Magni G., Human erythrocyte P5'NT activity, PN-1 is İdentical to p36. a protein associated to lopus inclusion formation in response to  $\alpha$ -interferon, Blood, 96:1596–1598, 2000
- 5- Anderson T. D.; Cheville N.F, Meador Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with Brucella abortus. II. Ultrastructural studies Vet Pathol., 23: 227-239 1986.
- 6- Arechaga G., Sanchez B., Pirierto I., Martinez JM., Alba F., Ramirez M., Subcellular Distribution of Leucine Aminopeptidase during the Development and Aging of Rat Brains, Rev. Neurol., 24:15003-15006, 1996.
- 7- Aronsen, K.F., Nosslin, B. and Pihl, B., The Value Gamma-glutamyl Transpeptidase Activity as a Screen Test for Liver Tumor., Acta Chir. Scand., 136, 17, 1970.
- 8- Aslan V, Eren Ü, Sevinç M, Öztok İ, Işık K. The changes of metabolic profile and its associatin with fat cow syndrome in high yielding cows during dry period and after. Turk J Vet Anim Sci; 18: 93–98, 1994.
- 9- Aslantaş, Ö., Babür, C., Kars Yöresinde Sığır ve Koyunlarda Bruselloz ve Toksoplazmoz Üzerine Seroepidemiyojik Araştırmalar, Etlik Vet. Mikrob. Derg., 11; (1-2), 47-55, 2000.

- 10-Aydın, H., Ankara Bölgesi Sığır ve Koyunlarda Serum GOT, GPT ve ALP Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar, Doktora Tezi, İstanbul, 1-50, 1993.
- 11-Bakan E., Klinik Biyokimya, Aktif Yayınevi, İstanbul, 2001.
- 12-Bauer, J.D., Ackermann, P.G., Toro, G., Bray's Clinical Laboratory Methods, 7 th ed., Saint Louis, C.V., Mosby Co., 399-401, 1968.
- 13-Berman P.A., Huma, L., Pegulation of 5-phosporibsyl 1-pyrophospate and hipoxanthine uptake and release in human erythrocytes by oxypurine cycling, J. Bio. Chem, 265: 6562–6568,1990.
- 14-Beuther E., Hartman G., Age-related changes in Red Cell Enzymes Cycle in Children with Transient Erythroblastopenia of childhood and with Hemolytic Anemia, Pedia. Reas. 19:44-47, 1985
- 15-Beutler E.; Baranko P. V.; Feagler, J.; Matsumoto, F.; Miro-Quesdada, M.; Selby, G.; Singh, P. : Hemolytic anemia due to pyrimidine-5-prime-nucleotidase deficiency: report of eight cases in six families. Blood 56: 251-255, 1980.
- 16-Birgel EH, Teffen S, Zerbe H., Investigation on the enzyme profile during the preparatory phase of birth in cattle. Praktische-Tierarzt, 78: 120-126, 1997.
- 17-Blood, D.C., Radostits, O.M., Henderson, J.A. Veterinary Medicine 8<sup>th</sup> Ed. Bailliere Tindal, London.: 1202-1212, 1462-1464,1986.
- 18-Bogin, E, Seligman, N.G. Holzer, Z., Avidar, Y. and Baram, H., Blood Profile of a Healthy Beef Herd Grazing Seasonal Mediterranean Range, J. Vet. Med. A, 35:270-276, 1998.
- 19-Boyd JW., Serum Enzymes in the Diagnosis of Diseases in Man and Animals, J. Comp. Path.,98:381-85, 1988.
- 20-Boyd JW, The Mechanisms Relating to Increases in plasma enzymes and Isoenzymes in Diseases of the animals, Vet. Clin. Path. 12 (2): 9-24, 1983
- 21-Boonprong S., Sribhen C., Choothesa A., Parvizi N., Vajrabukka C., Blood Biochemical Profiles of Thai Indigenous and Simmental × Brahman Crossbred Cattle in the Central Thailand, Journal of Veterinary Medicine Series A 54 (2), 62–65 2007.

- 22-Borovansky J., Blasko M., Siracky J., Not Only Fibroblasts But Also Melanoma Cells Express "Leucine Aminopeptidase" Activity, *Sb. Lek.*, 101: 127-130, 2000
- 23-Braun JP., Bonnefoi M., Rico AG., Comparison of the Diagnostic Significance of Enzymes in Man and Animals, *Adv. Clin. Enzym*, 6:228-233, 1988
- 24-Braun Jp, Bonnefoi M., Paviart I, Rico AG., Distribution of Alanine and Aspartate Aminotransferases, Gamma-glutamyl Transferase, Lactate Dehydrogenase, Alkaline Phosphatases and Creatine Kinase in the Main Organs of Adult and Month Old Goats. *Amin. Res. Vet.*, 18:4, 389-92, 1987.
- 25-Bulum KL., Mengi, A., Normal ve Fascioliasis'li Sığırlarda Serum AST, ALT, GGT, ALP Aktiviteleri ile Total Protein, Albümin, Total Bilirubin Düzeyleri Üzerine Araştırmalar, *İst. Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 26:2; 311-324, 2000
- 26-Burch, L., Vuillard, E., Guibourenche, ;, C., Gareli D., Oury, J., F., Luton, D., Prenatal Diagnosis and follow up of Biliary Atresia, *Brit. J. Obst and Gynae.*, 108:1108-1110, 2001
- 27-Canada SV. Tessaro L., Forbes B., and Turcotte C., A survey of brucellosis and tuberculosis in bison in and around Wood Buffalo National Park, *Can Vet J. March*; 31(3): 174–180, 1990.
- 28-Catlin JE., Sheehan EJ., Transmission of bovine brucellosis from dam to offspring. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;188:867–869
- 29-Champe, P.C., Harvey, R.A., *Biochemistry, (Çeviri) Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 1997.*
- 30-Charles ve ark. Charles, E., Cornelius, C.E., Bishop, J. and Rhode, E.A., Serum and Tissue Transaminase Activities in Domestic Animals., *Corn. Vet.*, 49:116-126,1959.
- 31-Clayton, B.E., Round, M., *Chemical Pathology and the Sick Child, Blackwe Scientific Publications, 20-192, 1984*
- 32-Cohen, L., Serum Enzyme Determinations: their reliability and value, *Med. Clin. North. Amer.*, 53:115, 1969.

- 33-Cook, L., Mitchell MS., Angle C., Stohs S., Assay of Human Erythrocyte Pyrimidine and Deoxypyrimidine 5'Nucleotidase by Isocratic Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chroma.*, 339; 293-301, 293.
- 34-Crawford, R.P.; Sanders, R.B.; Adams, L.G. Preventive Veterinary Medicine, 191-195.
- 35-Cunningham B.,The half-life of bovine (incomplete) antibodies to *Brucella abortus.*, *Vet Rec.*, 102: 500-502, 1978.
- 36-Davis DS., Heck FC., Williams JD., Simpson TR., and Adams LG.,Interspecific transmission of *Brucella abortus* from experimentally infected coyotes (*Canisatrans*) to parturient cattle *J Wildl Dis.*, 24: 533-537, 1988.
- 37-Denny HR., Brucellosis in the horse.*Vet Rec.* 90: 86-90, 972.
- 38-Dohoo R., Wright PF., Ruckerbauer GM., Samagh BS., Robertson FJ., and Forbes LB., A comparison of five serological tests for bovine brucellosis.*I Can J Vet Res*; 50(4): 485–493, 1986.
- 39-Duncan, J.R., Prasse, K.W., *Veterinary Laboratory Medicine, Clinical Pathology*, Iowa State University Pres, Ames, Iowa, 123-130, 1986.
- 40-Eichel V., Determination of leucine aminopeptidase in cow's milk, *Arch Exp Veterinarmed.*, 35(2):235-44, 1981.
- 41-Erdem I, Cicekler N, Mert D, et al. A case report of acute hepatitis due to brucellosis. *Int.J.Infect.Dis.*;9:349-350, 2005.
- 42-Ersoy, E., Bayşu, N., *Biyokimya*, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara, 1986.
- 43-Fini C., Ipata PL., Palmerini CA., Floridi A., 5' Nucleotidase from Bull Seminal Plasma, *Biochem. Biophysica Acta.*, 748: 405-412, 1983.
- 44-Fraser, C.M., *The Merck Veterinary Manual*, 903-906, 1986.
- 45-Fritzson P., Regulation of nucleotidase activities in animal tissues. *Adv. Ezyme Regul.* 16, 43–61.1978
- 46-Garcia MM., Brooks BW., Ruckerbauer GM., Rigby CE., and Forbes LB., Characterization of an atypical biotype of *Brucella abortus*. *Can J Vet Res.* July; 52(3): 338–342, 1988.

- 47-Goldberg DM, 5'-NT: Recent Advances in cell biology Methodology and Clinical significance General Review, digestion, 8:87-99, 1973.
- 48-Goldbarg, J.A., Pineda, E.P., Putenburg, A.M., The Measurement of Activity Leucine Aminopeptidase in Serum, Urine, Bile and Tissues., Amer. J. Clin. Pathol., 32:571-575, 1959.
- 49-Gonzales BJM., Navajo JA., Garcia DLC., Heruzo A., Seminal Plasma Leucine Aminopeptidase in Male Fertility, Androl. 17: 139-142, 1985
- 50-Gupta SK., Aziz M., Khan AA., Serum Leucine Aminopeptidase Estimation: A Sensitive Prognastic Indicator of Invasiveness in Breast Carcinoma. Indian J. Pathol. Microbiol., 32:301-305, 1989.
- 51-Güllüce, M. ve Leloğlu, N., Kars ve Çevresinde Sığır Serumlarında Brucella Antikorlarının Araştırılması için ELISA ve Diğer Metodların Karşılaştırılması., Vet. Hek. Dern. Derg., 64(4):27-34, 1993.
- 52-Gürsel, V., Kaya, N., Bakan, E., Gürsel, E., Karaciğer ve pankreas hastalarında 5'Nükleotidaz, Alkalan Fosfataz ve Amino Transferaz Düzeylerinin araştırılması., Biyokimya Dergisi, 13(39): 61-68, 1988
- 53-Grünwaldt, E.G., Guevara, J.C., Estevez, O.R., Vicente, A., Rousselle, H., Alcuten, N., Aguerregaray, D., Stasi, C.R., Biochemical and Haematological Measurements in Beef Cattle in Mendoza Plain Rangelands (Argentina), Tropical Animal Health Production, 37; 527-540, 2005
- 54-Hall R, The activity of chlorhexidine gluconate against Brucella abortus., Vet Rec. 105: 305–306, 1979.
- 55-Heinz, F., Pilz, R., Rechel, S., A New Spectrophotometric Method for the Determination of 5'-Nucleotidase, J. Clin. Chem. 18:781-788, 1980
- 56-Henry, J.B., Clinical Diagnosis and Manegement by Laboratory Methods, Philadelphia, WB Saunders, 262-395, 1984
- 57-Holdrsworth, G., Coleman, R., Enzyme of Mamalian Bile, Biochim. Biophys. Acta, 389: 47-50, 1975.
- 58-Hong C.B., Donahue JM, Giles RC, Jr;KB., Poonacha P A., Tuttle N. F., Brucella abortus-associated meningitis in aborted bovine fetuses. Cheville Vet Pathol 28: 492-496 1991.

- 59-Hopkinson, D.A., Swallow, D.M., Marinaki, A., Harley, E., H, Primidine 5' Nucleotidase Activity in Normal and Different Human Lymphoblastoid Cells, *J. Inter. Met. Diass.* 13:701,706, 1990
- 60-Hopper BR., Sanborn MR., Bantle JA., Detection of *Brucella abortus* in mammalian tissue, using biotinylated, whole genomic DNA as a molecular probe., *Am J Vet Res.*, Dec;50(12):2064-8, 1989.
- 61- Hossain, M. A., Yamato, O., Yamasaki, M., Otsuka, Y. and Maede, Y. 2003. Relation Between Reticulocyte Count and Substrate Specificity of Erythrocyte 5'-Nucleotidase Activity in Dogs, Cats, Cattle and Humans. *J. Vet. Med. Sci.* 65 : 193-197
- 62-Hudson M., Child K. N., Hatler D. F., Fujino K. K, and. Hodson K. A, Brucellosis in Moose (*Alces alces*). A Serological Survey in an Open Range Cattle Area of North Central British Columbia Recently Infected with Bovine Brucellosis *Can Vet J.* February; 21(2): 47–49 1980.
- 63-Inokuma S., Setoguchi K., Ohta T., Matsuzaki Y., Yoshida A., Serum Leucine Aminopeptidase as an Activity Indicator in Systemic Lupus Erythematosus, A study of 46 Consecutive Cases, *Rheum (Oxford)* 38: 705-708, 1989.
- 64-Ipata P.L. and Cercignani, G., The Effect of pH on the Allosteric Properties of Sheep Brain 5' Nucleotidase, *FEBS Lett.* 2;7(2):129–131, 1970.
- 65-İyisan, A.S., Akmaz, Ö., Düzgün, S. G., Ersoy, Y., Eskiizmirli, S., Güler, L., Gündüz, K., Işık, N., İçyerioğlu, A.K., Kalender, H., Karaman, Z., Küçükayan, U., Özcan, C., Seyitoğlu, Ş., Tuna, İ., Tunca, T., Üstünakın, K., Yurtalan, S., Türkiye'de Sığır ve Koyunlarda Brucellosis'in Seroepidemiolojisi, *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, 31(1):21-75, 2000.
- 66-Jacob SK, Ramnath V, Philomina PT, Raghunandhan KV, Kanan A. Assessment of physiological stress in periparturient cows and neonatal calves. *Indian J Physiol Pharmacol.*, 45: 233-238, 2001
- 67-Jeffery P Taylor And James N Perdue The Changing Epidemiology of Human Brucellosis In Texas, *Am. J. Epidemiol.* 130: 160–165, 1989.



- 68-Jovanovic MJ, Rajic I, Pesterac V, Crcev D, Cokrevski S. Blood parameters in cows in advanced stages of gravidity and following parturition fed with rations of different structure. *Veterinarski Glasnik* 51: 231-244,1997.
- 69-Jonanovic, M.J., Stamatavic, S., Damnjanovic, Z., Boros, I., Pivnicki, B., Ivanov, I., Blood Chemical Values of Recently Calved Cows With Liver Disorders, *Vet.Glas.*, 44:7, 535-504, 1990.
- 70-Kaneko, J.J., *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic pres, 4th edition, London, 1989
- 71-Karagül, H., Fidancı, U. R., Altıntaş, A., Sel, T., *Klinik Biyokimya*, 2000, 1. Baskı, Medisan Yayıncılık, Ankara
- 72-Kaplan, M., Hammerman, C., Beuther, E., Hyperbilirubinemia, Glucose-6-phosphate dehidrogenaz Deficiency and Gilbert Sendrome, *European J. Pedit.* 60:195, 2001
- 73-Kaya, N., *Biyokimya*, Atatürk Üniv. Yayınları, Erzurum,1993.
- 74-Kaya, N., Akın, V., İnsan Plasentası ve Gebe Serumlarından Safılaştırılan Lösin Aminopeptidazın Maksimum Aktivitesi için En Uygun Şartların Araştırılması., *Atatürk Üniv. Tıp Bült.*, 22(1): 227-232, 1990.
- 75-Kaya, N., Karaciğer ve Pankreas Hastalıklarında Lösin Aminopeptidaz ve Diğer bazı Enzimlerin Serumdaki Aktivite Seviyelerinin Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 1986.
- 76-Kellar J., Marra R., Martin W., Brucellosis in Ontario: a case control study.*Can J Comp Med.*, 40(2): 119–128, 1976
- 77-Kerkhofs, P.; Botton, Y.; Thiange, P.; Dekeyser, P.; Limet, J.N.. Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. *Vet. Microbiol*, 73–80.
- 78-Khan A, Bashir M, Ahmad KM, Javed MT, Tayyab KM, Ahmad M. Forecasting neonatal lamb mortality on the basis of haematological and enzymological profiles of Thalli ewes at the pre-lambing stage. *Small Rumin Res* 2002; 43: 149-156.

- 79-Khanolkar MM., Sirsat AV., Deshmane V., Kamat MR., Serum Leucine Aminopeptidase Levels As a Marker in Testicular Tumours, India J. Med. Res., 96:372-375, 1992.
- 80-Kim, N.K., Yasmineh, W.G., Freler, E.F., Goldman, A.I. and Theologides, A., Value Alkaline Phosphatase, 5'-Nucleotidase, Gamma-Glutamyltransferase and Glutamate Dehydrogenase Activity Measurements (Single and Combined) in Serum Diagnosis of Metastasis to the Liver, Clin. Chem.,23(11):2034-2038, 1977.
- 81-Kobayashi H., Sakura H., Kurauchi O., Mizutani S., Significance of Serum Leucine Aminopeptidase (P-LAP) Determination in the Gynecological Malignancies, Nip. San. Fuji Gak. Zas. 37:696-702, 1985.
- 82-Kowlessar, O.D., Haeflner, L.J. et al., Comparative Study of Serum Leucine Aminopeptidase, 5'-Nucleotidase and non-specific alkaline phosphatase in disease affecting the Pancreas, hepatobiliary tree and bone, Amer. J. Med. 31:231-237, 1961
- 83-Kramer J,W., Clinical Enzymology. In: Kaneko, JJ. Cornelius. C.E., Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Fourth Edition, Acad, Pres. Inc., 338-363
- 84-Laker, M. F., Klinik biyokimya, 1998, Nobel Güneş Kitabevi, İstanbul
- 85-Lapraik RD. and Moffat R.; Latent bovine brucellosis Vet Rec. 1982 111: 578-579.
- 86- Lassauzet M L, Thurmond M C, Johnson W O, Stevens F, and Picanso J P.; Effect of brucellosis vaccination and dehorning on transmission of bovine leukemia virus in heifers on a California dairy. Can J Vet Res. 54(1): 184–189, 1990
- 87-López A., Hitos F., Pérez A., and Navarro-Fierro RR., Lung lesions in bovine fetuses aborted by Brucella Abortus, Can J Comp Med. 48(3): 275–277, 1984.
- 88-Lorry B. Forbes and Thomas B. An outbreak of Brucella abortus biovar 2 in Canadian cattle Steele, Can Vet J., ; 30(11): 888–893. 1989.

- 89-Lum, G. And Gambino, S. R., Serum Gamma-glutamyl Transpeptidase Activity as an Indication of Disease of Liver, Pancreas or Bone., Clin. Chem., 18,358, 1972.
- 90-MacDiarmid, S.C.; Hellstrom, J.S., An intradermal test for the diagnosis of brucellosis in extensively managed cattle herds, Preventive Veterinary Medicine, 361-369, 1987.
- 91-MacMillan AP., A retrospective study of the serology of brucellosis in horses Vet Rec. 117: 638-639 1985.
- 92-Marinaki, A. M.; Escuredo, E.; Duley, J. A.; Simmonds, H. A.; Amici, A.; Naponelli, V.; Magni, G.; Seip, M.; Ben-Bassat, I.; Harley, E. H.; Thein, S. L.; Rees, D. C. : Genetic basis of hemolytic anemia caused by pyrimidine 5-prime-nucleotidase deficiency. Blood 97: 3327-3332, 2001.
- 93-Matsumoto H., Nagasaka T., Hattori A., Rogi T., Tussuruoka N., Mizutani S., Tusujimoto M., Expression of Placental Leucine Aminopeptidase Oxytocinase in Neuronal Cells and Its Action on Neuronal Peptidase, Eur. J. Biochem., 268:3259-66, 2001.
- 94-McGillivray DJ., Webber JJ., Edwards LD., Restriction endonuclease analysis of Brucella abortus. Res Vet Sci., 45 (2):251–252 1988.
- 95-Mengi A, Serpek B., Bilal T., Normal ve Hasta Köpeklerin Serumlarında, GOT, GPT, GGT Aktiviteleri ile Seruloplazmin Konsantrasyonu Üzerine Çalışmalar, İstanbul Üniv. Vet. Fak. Dergisi, 9: 21-27, 1983
- 96-Montgomery, R., Conway, T.W., Chappel, D., Biochemistry, A case-Oriented Approach, 6th Edition, Mosby-Year Book, Inc.1996.
- 97-Murray, R.K., Granner, K. D., Mayes, P. A.; Rodwell, V. W.; Harper'in Biyokimyası, 1993, Barış kitabevi, İstanbul
- 98-Nielsen KH., Wright, P.F. Kelly, W.A., Cherwonogrodzky J.H., A review of enzyme immunoassay for detection of antibody to Brucella abortus in cattle, Veterinary Immunology and Immunopathology, 331-347.
- 99-Nissumura, M., Teschke, R., Effect of Choric Alcohol Consumption on the Actives of Liver Plasma Membrane Enzymes: GGT, ALP and 5' Nu., Biochem. Pharm. 31 (3): 377-381, 1982.

- 100- Otto , F., Ibanez, A., Caballera, R., Bogin, E., Blood Profile of Paraguayan Cattle in Relation to Nutrition, Metabolic State of Tabasco, *Vet. Mex.*, 25:4, 327-331, 1994.
- 101- Ozaras R, Celik A, Demirel A. Acute hepatitis due to brucellosis in a laboratory technician. *Eur J Intern Med*;15:264 2004.
- 102- Ögün M., Kars ve Yöresindeki Koyunlarda Serum ve Süt Lösün Aminopeptidaz Aktivitelerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kars, 2003.
- 103- Özcan, A., Kaya, N., Karapehlivan, M., Determination of urine leucine aminopeptidase activity in pregnant sheep., *Israel J. Vet. Med.*, 54 (2):36-38,1999.
- 104- Paglia DE.; Valentine, W. N.; Brockway, R. A. : Identification of thymidine nucleotidase and deoxyribonucleotidase activities among normal isozymes of 5-prime-nucleotidase in human erythrocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81: 588-592, 1984.
- 105- Pineda, E.P., Golldbarg, J.A., Rutenburg, A.B., Serum Leucine Aminopeptidase in Pancreatic and Hepatobiliary Diseases, *Gastroenterology*, 38: 698-712, 1960.
- 106- Podolsky DK., Isselbacher K.J., Evulation of iver Function . *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 14<sup>th</sup> edition Mc Graw Hill International Edition, 1998.
- 107- Rackley RR., Yang B., Pretlow TG., Abdul-Karim FW., Lewis TJ., McNamara N., Delmoro CM., Bradley EL Jr., Kursh E., Resnick MI., Differences in the Leucine Aminopeptidase Activity in Extracts from Human Prostatic Carcinoma and Bening Prostatic Hyperplasia, *Cancer*, 68:587-593, 1991.
- 108- Radostits OM., Blood DC., Gay CC., *Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, Eighth Edition, London, 787-800, 1994.
- 109- Rees, DC., Duley, J. A., Marinaki, M.A., Pyrimidine 5'nucleotidase Deficiency, *Brits. J., Haem.* 120:375-283, 2003

- 110- Renaud, CP., Solillet, G., Lahet, C., Sotta, C., Mathieu, M., Mousson, B., Serum 5'NT and ALP Activities After High Dose Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation in Case of Malignacy in Children, *Ann. Biol. Clin.*, 53: 125-130, 1995
- 111- Robert L. Jones, Billy L. Deyoe, Margaret E. Meyer, Gerald M. Buening, and William H. Fales Isolation of Two *Brucella abortus* Biotypes from Tissues of a Naturally Infected Cow *J. Clin. Microbiol.* 16: 641–643, 1982.
- 112- Rutenburg, A.B., Goldbarg, J.A., Pineda, E.P., Leucine Aminopeptidase activity, *New Engl. J. Med.*, 259(10): 469, 1958.
- 113- Sakai T., Yanagihara S., Ushio, K., Determination of 5'Nucleotidase Activity in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography, *J.Chroma.*, 239; 717-721, 1982.
- 114- Salman, Mowafak D.; Meyer, Margaret E., Epidemiology of bovine brucellosis in the coastal region of Baja California Norte, Mexico: Results of path analyses in an area of high prevalence. *Preventive Veterinary Medicine*,4: 485-502,1987.
- 115- Sanda K., Serum Enzyme Activities in Dairy Cattle Considerations of Their Diagnostic Significance in Experimental and Clinical Cases. *Jnp. J. Vet. Res.*, 31-97, 1983.
- 116- Sapey T., Mendler M.H., Guyader D., Morio O., Corbinais S., Deugnier Y., Brissot P., Respective Value of Alkaline Phosphatase, Gamma-Glutamyl Transpeptidase 5'NT Serum Activity in the Diagnosis of Cholestasis. *J.Clin.Gastr.* 30:259-262, 2000.
- 117- Schumacher, M., Elimination Kinetics of the Enzymes CK, AST, SDH and GGT from the Blood of Cattle of Different Ages., *Tierarztliche Hochschule, Hannover, Germany*, 110, 1992.
- 118- Seitanidis, B., Moss, D., W., Serum Alkaline phosphates and 5'nucleotidase levels during normal pregnancy, *Clin. Chim. Acta* 25:183-184, 1969.

- 119- Sevinç M, Başoğlu A, Birdane F, Gökçen M, Küçükfindık M. The changes of metabolic profile in dairy cows during dry and after. Turk J Vet Anim Sci; 23: 475–478, 1999.
- 120- Sevindik, A., Değişik Yörelerdeki Çeşitli Koyun ve Sığır Irklarında Bazı Kan Parametrelerin Araştırılması, Doktora Tezi, İstanbul Üniv. Vet. Fak. Kütüp.1-46,1996.
- 121- Stacy V.,The Existing and Potential Importance of Brucellosis and Tuberculosis in Canadian Wildlife: A Review Can Vet J. 27(3): 119-122, 123-123, 1986.
- 122- Stemshorn BW., Bovine Brucellosis Diagnosis and Eradication Can Vet J. 1985 January; 26(1): 35–39.
- 123- Sutherland, S.S., The anamnestic response to Brucella abortus-infected and vaccinated cattle. Vet. Microbiol. 405-409
- 124- Sutherland, S.S Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of cattle infected with Brucella abortus., 23–32.
- 125- Swallow, D. M.; Turner, V. S.; Hopkinson, D. A. : Isozymes of rodent 5-prime-nucleotidase: evidence for two independent structural loci UMPH-1 and UMPH-2. Ann. Hum. Genet. 47: 9–17, 1983.
- 126- Swann Al., Schnurrenberger PR., Brown RR., and Garby CL.Brucella abortus isolations from wild animals, Vet Rec., 106: 57, 1980.
- 127- Şeyda ve ark.- Şeyda, T., Aydın, F., Genç, O., Güler M. A. ve Baz, E., Sığır Serumlarında Mikroaglütinasyon Testi (MAT) ile Teşhisi Üzerine Araştırmalar, Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., 3(1):67-72, 1997
- 128- Tainturier D, Braun JP, Rico AG, Thouvenot JP. Variations in blood composition in dairy cows during pregnancy and after calving. Res Vet Sci 1984; 37: 129-131.
- 129- Thompson R, Jansen PLM. Genetic defects in hepatocanalicular transport. Sem Liv Dis. 20: 365-371,2000.
- 130- Torrance J., West, C., Beutler, E.; A Simple Radiometric Assay for Pyrimidine-5'-Nucleotidase, J. Lab. Clin. Med., 90(3): 563-568, 1977
- 131- Turgut K., Vetriner Klinik Laboratuar Teşhis, 1-50, 1995

- 132- Urley SK, David PR., Taylor A., Lipscomb WN., Molecular Structure of Leucine Aminopeptidase at 2,7-Å Resolution, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:6878-6882, 1990.
- 133- Valentine, W. N.; Fink, K.; Paglia, D. E.; Harris, S. R.; Adams, W. S. Hereditary hemolytic anemia with human erythrocyte pyrimidine 5-prime-nucleotidase deficiency. J. Clin. Invest. 54:866-879, 1974.
- 134- Vojtisek B, Veznik Z, Toulova M, Urbanova J. Development of AST, ALT and GGT in the blood serum of dairy cows in the last month of pregnancy and the puerperium in relation to liver function. Veterinarni Medicina; 28: 13-20. 1983.
- 135- Wells, A.B., Halsted A.J., Clinical Pathology, 5' nucleotidase, Philadelphia, WB Saunders, 216, 1969.
- 136- West HJ. Liver function of dairy cows in late pregnancy early lactation. Res Vet Sci 1989; 46: 231- 237.
- 137- Yıldız H., Balıkçı E., Kaygusuzoğlu E., İneklerde Gebelik Sürecinde Ve Erken Postpartum Döneminde Önemli Biyokimyasal Ve Enzimatik Parametrelerin Araştırılması, F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi, 19(2), 137–143, 2005.
- 138- [www.clinchem.org/cgi/content](http://www.clinchem.org/cgi/content)
- 139- [www.expasy.org/cgi-bin/](http://www.expasy.org/cgi-bin/)
- 140- [www.genome.ad.jp/dbqet\\_bin/](http://www.genome.ad.jp/dbqet_bin/)
- 141- <http://guncel.tgv.org.tr/journal/12/pdf/148.pdf>

## 10.ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Kars'ta doğdum. İlkokulumu Kars İsmetpaşa İlkokulunda, orta öğrenimimi Kars Gazi Kars Ortaokulu ve Lise öğrenimimi ise Kars Alpaslan Lisesi'nde tamamladım. Lisans öğrenimimi Kafkas Üniversitesi Fen-Ede. Fakültesi Kimya bölümünde 1997'de bitirdim. 1998 yılında Kafkas Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Bilim Dalında mastera başladım. 2002 yılında yine aynı üniversitede Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora başladım. 1998-2007 yılları arasında Araştırma Görevlisi olarak görevimi sürdürdüm. Şimdi ise EÜAŞ Teknik Kontrol ve Laboratuvarlar İşletme Müdürlüğü'nde Yakıt Laboratuvarı şefi olarak görev yapıyorum.