



T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KONJENİTAL ADRENAL HİPERPLAZİLİ ÇOCUKLARDA SERUM  
PROLİDAZ AKTİVİTESİNİN ANTIOKSİDAN ENZİM KAPASİTESİYLE  
İLİŞKİSİ**

Ferhat YILDIZ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. İclal Geyikli ÇİMENCİ

Gaziantep  
2020



T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KONJENİTAL ADRENAL HİPERPLAZİLİ ÇOCUKLARDA SERUM  
PROLİDAZ AKTİVİTESİNİN ANTIOKSİDAN ENZİM KAPASİTESİYLE  
İLİŞKİSİ**

Ferhat YILDIZ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. İclal Geyikli ÇİMENCİ

Gaziantep  
2020

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olup tezin planlanması ve yazım aşamasında etik dışı davranışım olmayıp, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurullar içinde elde ettim. Bu tez çalışmasında elde edilen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynak listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edecek herhangi bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

16.09.2020

Ferhat YILDIZ

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı danışmanım Prof. Dr. İclal GEYİKLİ ÇİMENCİ'ye teşekkür ederim.

Yüksek lisans dönemim boyunca tecrübesiyle yol gösterici olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet TARAĞÇIOĞLU'na teşekkür ederim.

Tezimin klinik çalışmalarında yardımcı olan, tez çalışmam süresince her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Murat KARAOĞLAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmam boyunca tezin her aşamasında çalışmalarına yardımcı olan, her konuda tecrübelerini ve bilgilerini paylaşan Arş. Gör. Hasan ULUSAL'a, tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Mehmet Akif BOZDAYI'ya ve diğer Tıbbi Biyokimya asistanlarına teşekkür ederim.

Bana her konuda destek olan, her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu başkanlığı tarafından TF.YLT.19.61 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Ferhat YILDIZ

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	iv
TABLolar LİSTESİ .....	v
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vi
EK LİSTESİ.....	viii
ÖZET .....	1
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ ve AMAÇ .....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Sitokrom P450 Enzim Sistemi .....	5
2.2. Sitokrom P450 ailesi .....	5
2.3. CYP450 ile Reaktif Oksijen Türleri Üretimi .....	6
2.3.1. Sitokrom P450 enzimatik döngüsü .....	7
2.4. CYP450 enzimlerinin insan hastalıklarındaki rolü .....	8
2.5. Konjenital Adrenal Hiperplazi .....	8
2.5.1.Epidemiyoloji.....	8
2.5.2. Genetik.....	9
2.5.2.Patofizyolojisi .....	9
2.5.3. Klinik Bulgular.....	11
2.5.3.1. Tuz kaybettiren 21-hidroksilaz eksikliği.....	11
2.5.3.2.Basit virilize edici 21-hidroksilaz eksikliği.....	12
2.5.3.3.Klasik olmayan 21-hidroksilaz eksikliği.....	12
2.6. Prolidaz .....	14
2.6.1. Prolidaz Geni.....	14
2.6.2. Prolidazın Genel Özellikleri.....	14
2.7. Malondialdehit .....	18
2.8. Süperoksit Dismutaz .....	19
2.9. Paraoksanaz ve Arilesteraz .....	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM .....	23
3.1. Materyal ve Yöntem.....	23
3.2. Parametrelerin Ölçülmesi.....	24
3.2.1. Rutin Analizler.....	24

3.2.2. Prolidaz, MDA ve SOD Ölçümünde Kullanılan Aletler .....	24
3.2.3. Prolidaz .....	24
3.2.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	24
3.2.3.2. Prolidaz Aktivitesinin Ölçümü.....	25
3.2.3.3. Ayıraçlar.....	26
3.2.3.4. İşlem.....	26
3.2.3.5. Prolidaz Aktivitesini Hesaplanması .....	28
3.2.4. Malondialdehit (MDA) .....	29
3.2.4.1. Ayıraçlar.....	29
3.2.4.2. İşlem.....	30
3.2.4.3. MDA Düzeylerinin Hesaplanması .....	30
3.2.5. Superoksit Dismutaz .....	30
3.2.5.1. Ayıraçlar.....	31
3.2.5.2. İşlem.....	31
3.2.5.3. SOD Aktivitesinin Hesaplanması.....	32
3.2.6. Paraoksanaz.....	32
3.2.7. Arilesteraz .....	32
3.2.8. İstatistiksel Yöntem.....	33
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>34</b>
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>41</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>46</b>
<b>7. EK.....</b>	<b>52</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 2.1:</b> CYP450'lerin ROT aracılı insan hastalıklarına katkıda bulunduğu mekanizma.....	6
<b>Şekil 2.2:</b> CYP450 Reaksiyon Mekanizması.....	7
<b>Şekil 2.3:</b> CYP21A2 tarafından katalize edilen reaksiyonlar.....	10
<b>Şekil 2.4:</b> Adrenal steroid hormon sentezinin yolları.....	10
<b>Şekil 2.5:</b> Amid bağının vurgulandığı dipeptit Gly-Pro'yu içeren prolidaz reaksiyonu.....	15
<b>Şekil 2.6:</b> Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA.....	18
<b>Şekil 2.7:</b> SOD'lar tarafından ortak temizleme mekanizması.....	20
<b>Şekil 3.1:</b> Prolin Oluşumu.....	25
<b>Şekil 3.2:</b> Ninhidrin+ Prolin Oluşumu.....	25
<b>Şekil 3.3:</b> MDA- TBA kompleksinin oluşumu.....	29
<b>Şekil 4.1:</b> Prolidaz düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı.....	35
<b>Şekil 4.2:</b> MDA düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı.....	36
<b>Şekil 4.3:</b> SOD düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı.....	36
<b>Şekil 4.4:</b> PON düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı.....	37
<b>Şekil 4.5:</b> ARE düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı.....	37

## TABLULAR LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 4.1:</b> Çalışma grubunun demografik verileri.....	34
<b>Tablo 4.2:</b> Çalışılan parametre sonuçlarının hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılması.....	35
<b>Tablo 4.3:</b> Çalışılan parametre sonuçlarının KAH tipleri arasında karşılaştırılması.....	38
<b>Tablo 4.4:</b> Hasta grubunda biyokimyasal parametrelerin KAH tipleri arasında karşılaştırılması.....	38
<b>Tablo 4.5:</b> Hasta grubu korelasyon analizi.....	39
<b>Tablo 4.6:</b> Kontrol grubu korelasyon analizi.....	40

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

17-OHP	17-Hidroksiprogesteron
Ala	Alanin
AR	Androjen Reseptörünün
ARE	Ariesteraz
BHT	Bütil Hidroksi Toluen
BV	Basit Virilizan
Cu	Bakır
CYP21A2	Steroid 21-Hidroksilaz
CYP450	Sitokrom P450
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Gly	Glisin
Gly-Pro	Glisin-Prolin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
KAH	Konjenital Adrenal Hiperplazi
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
Leu	Lösin
MDA	Malondialdehit
Met	Metiyonin
MetAP	Metiyonin Aminopeptidaz
Mg <sup>2+</sup>	Magnezyum
Mn <sup>2+</sup>	Mangan
MnCl <sub>2</sub>	Mangan (II) Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NKAH	Nonklasik Konjenital Adrenal Hiperplazi

NO	Nitrik Oksit
PEPD	Prolidaz Geni
Phe	Fenilalanin
PON	Paraoksanaz
Pro	Prolin
RAT	Reaktif Azot Türleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
SOD	Superoksit Dismutaz
SS	Standart Sapma
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TCA	Trikloroasetik asit
TKT	Tuz Kaybettiren Tip
Val	Valin
VKİ-SDS	Vücut Kitle İndeksi Standart Sapma
XO	Ksantin Oksidaz

## EK LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Ek 1:</b> Etik Kurul Karar Formu.....	52



## ÖZET

### KONJENİTAL ADRENAL HİPERPLAZİLİ ÇOCUKLARDA SERUM PROLİDAZ AKTİVİTESİNİN ANTIOKSİDAN ENZİM KAPASİTESİYLE İLİŞKİSİ

Ferhat YILDIZ

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İclal Geyikli ÇİMENCİ

Eylül 2020, 65 sayfa

Bu çalışmada Konjenital Adrenal Hiperplazi'li hastalarda prolidaz aktivitesinin antioksidan moleküllerle ilişkisinin diğer parametrelerle bir arada incelenmesi ve bu ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmaya Konjenital Adrenal Hiperplazi tanısı konulmuş 85 gönüllü hasta, yaş ve cinsiyet uyumlu 43 gönüllü sağlıklı dahil edilmiştir. Prolidaz aktivitesinin ölçümü modifiye Chinard yöntemiyle, MDA düzeyleri tiyobarbitürik asit yöntemiyle, SOD aktivitesi Sun ve arkadaşları tarafından önerilen yöntemle, Paraoksanaz ve Arilesteraz düzeyleri ise Rel Assay tarafından geliştirilen tam otomatik yöntemle ölçüldü. Hasta ve kontrol grupları arasında yaş ve cinsiyet bakımından anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). Prolidaz aktivitesi sağlıklı kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). Hasta grubunda MDA düzeyleri sağlıklı gruba göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. ( $p<0,05$ ). SOD düzeyleri hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ). PON ve ARE düzeyleri açısından hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). Hasta grubunda 17 OH progesteron ve 11 deoksikortizol düzeyleri KAH tipleri arasında anlamlı derecede fark bulundu. Konjenital Adrenal Hiperplazinin reaktif oksijen türleri ürettiğini, hastalarda oksidatif stresin arttığını, hücreleri serbest radikal hasarına karşı oluşan savunma sisteminin aktivitesindeki düşüşünü gördük. Ayrıca prolidaz aktivitesinin düzenliğinin kollajen metabolizmasında bozulmalar olarak kendini gösterdiğini gözlemledik. Bu çalışmanın bize KAH'da prolidaz aktivitesinin rolünün ve antioksidan moleküllerle ilişkisinin yeni yaklaşımların ortaya çıkması açısından önemli olduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** antioksidan, konjenital adrenal hiperplazi, malondialdehit, prolidaz, süperoksit dismutaz

## ABSTRACT

### SUMMARY THE RELATIONSHIP OF SERUM PROLIDASE ACTIVITY WITH ANTIOXIDAN ENZYME CAPACITY IN CHILDREN WITH CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA

Ferhat YILDIZ

Master Thesis, Department of Medical Biochemistry

Supervisor: Professor Dr. İclal Geyikli ÇİMENCİ

September 2020, 65 pages

In this study, it was aimed to examine the relationship between prolidase activity and antioxidant molecules together with other parameters in patients with congenital adrenal hiperplasia and to investigate this relationship. In this page, 85 volunteer patients diagnosed with Congenital Adrenal Hyperplasia and 43 essential healthy individuals who are matched for age and gender are included. Prolidase activity was measured by the modified Chinard method, MDA levels by thiobarbituric method, SOD activity by Sun et al., Paraoxanase and Arylesterase levels were measured by a fully automated method in Relay Assay. No significant difference was found between the patient and control groups in terms of age and gender ( $p > 0.05$ ). Prolidase activity was found to be significantly higher in the patient group compared to the healthy control group ( $p < 0.05$ ). MDA levels in the patient group were found to be significantly higher than the healthy group. ( $p < 0.05$ ). SOD levels were found to be significantly lower in the patient group compared to the healthy control group ( $p < 0.05$ ). No significant difference was found between the patient group and the control group in terms of PON and ARE levels ( $p > 0.05$ ). Significant differences were found in 17 OH progesterone and 11 deoxycortisol levels between the types of CAH in the patient group. We have seen that Congenital Adrenal Hyperplasia produces reactive oxygen species, increased oxidative stress in patients, and a decrease in the activity of the defense system against free radical damage. In addition, we observed that the regularity of prolidase activity manifested itself as disruptions in collagen metabolism. This study suggests that the role of prolidase activity in CAH and its relationship with antioxidant molecules are important for the emergence of new approaches.

**Key Words:** antioxidant, congenital adrenal hiperplasia, malonedialdehyde, prolidase, superoxide dismutase

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Konjenital Adrenal Hiperplazi (KAH), adrenal kortekste kortizol sentezi için gerekli olan 5 enzimden birinin eksikliğine bağlı olarak gelişen, otozomal resesif bir hastalık grubudur (1). KAH hastalarının %90'dan fazlasında 21-Hidroksilaz enzim eksikliği bulunur ve bu da kortizol üretim kusuruna sebep olur (2). Kortizol eksikliğinde, adrenal yetmezlik gelişir ve hayatı tehdit eder. Enzim eksikliği derecesi değişken olduğu için klinik tablo da değişir. Klinik olarak klasik ve klasik olmayan şeklinde sınıflandırılır (1).

Klasik KAH formunun küresel insidansı, tarama programları tarafından belirlenen 1:15.000 canlı doğumdur (3). İnsidansı bazı etnik gruplarda ve coğrafik bölgelerde değişmektedir. Klasik olmayan KAH (NKAH) olgularının belirlenmesinde yenidoğanın taranması yetersiz kaldığından, gerçek insidansı bilinmemektedir (1).

İnsanda, sitokrom P450 enzimlerinin katalizledikleri çok önemli reaksiyonlar bulunmaktadır. Bunlardan birisi steroid hormon biyosentezidir. Steroid 21-hidroksilaz (CYP21A2), ağırlıklı olarak adrenal kortekste eksprese edilen bir mikrozomal P450'dir. CYP21A2'deki mutasyonlar, steroidojenez yolundaki kusurlardan kaynaklanan otozomal resesif hastalıklar ailesi olan KAH'a yol açar (4).

Sitokrom P450 (CYP450) bir reaktif oksijen türleri (ROT) kaynağıdır. ROT, CYP450 katalitik döngüsünün parçalanması veya ayrılmasının ardından ortaya çıkar. ROT'un tümü, hidroksil radikal oluşumuna yol açarak patolojik etkilerinin çoğunu gösterir. Hidroksil radikali veya yakından ilişkili bir tür, muhtemelen en serbest radikal kaynaklı doku hasarının nihai aracıdır (5). Süperoksit dismutaz (SOD) ROT'a karşı ilk savunma hattını oluşturur. SOD, süperoksit radikalini ( $O_2^-$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) katalizleyen enzimatik bir antioksidandır (6).

Prolidaz, C-terminal ucunda bir prolin veya hidroksiprolin kalıntısının bulunduğu imidodipeptitleri ayrıştırma yeteneğine sahip çok işlevli bir enzimdir. Prolidazlar, prolin geri dönüşümüne katıldıkları düşünülen arka ve bakterilerden izole edilmiştir. Memeli türlerinde, prolidazlar sitoplazmada bulunur ve esas olarak protein katabolizmasının son aşamasında, özellikle kollajenin biyosentezi ve bozulması sırasında prolin serbest bırakma işlevi görür. Kollajen vücuttaki toplam proteinin yaklaşık üçte birini içerir ve doku yapısını ve bütünlüğünü korumak için gereklidir (7).

Prolidaz aktivitesinin rolü ve antioksidan moleküllerle ilişkisinin KAH'lı hastalardaki yeni yaklaşımların ortaya çıkması yönünden önemli olduğu düşünülmüştür. Dolayısıyla bu çalışmada KAH'lı hastalarda prolidaz aktivitesinin antioksidan moleküllerle ilişkisinin diğer parametrelerle bir arada incelenmesi ve bu ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Sitokrom P450 Enzim Sistemi

Sitokrom P450 monoksijenazlar (CYP450), genellikle fizyolojik koşullar altında, nispeten basit alkanlar veya yağ asitleri dahil olmak üzere çok çeşitli moleküller üzerinde birçok farklı oksidatif dönüşümün yanı sıra steroidler ve ekzojenözler de dahil olmak üzere birçok farklı oksidatif dönüşümü katalize edebilen tiyolat hem proteinleridir (8).

CYP450 üst familyası çok sayıda hem içeren monoksijenazdan oluşur. Birçok insan CYP450'si insan hastalıklarını tedavi etmek için kullanılan ilaçları metabolize eder. Diğerleri insan fizyolojisi için gerekli olan endojen bileşiklerin sentezi için gereklidir. CYP450 enzimleri tüm biyolojik krallıklarda bulunur ve şimdiye kadar filumların çoğunluğu incelenir. İnsanlarda 57 CYP450 tanımlanmıştır ve hala bu enzimlerin özellikleri ve farklı hastalıklardaki rolleri hakkında yeni bilgiler ortaya çıkmaya devam etmektedir. Genel olarak, tıbbi alaka düzeyine sahip CYP450'ler, önemli endojen substratlar üzerinde etkili olan ve birçok durumda seviyelerini kontrol eden enzimlerdir (9,10).

### 2.2. Sitokrom P450 ailesi

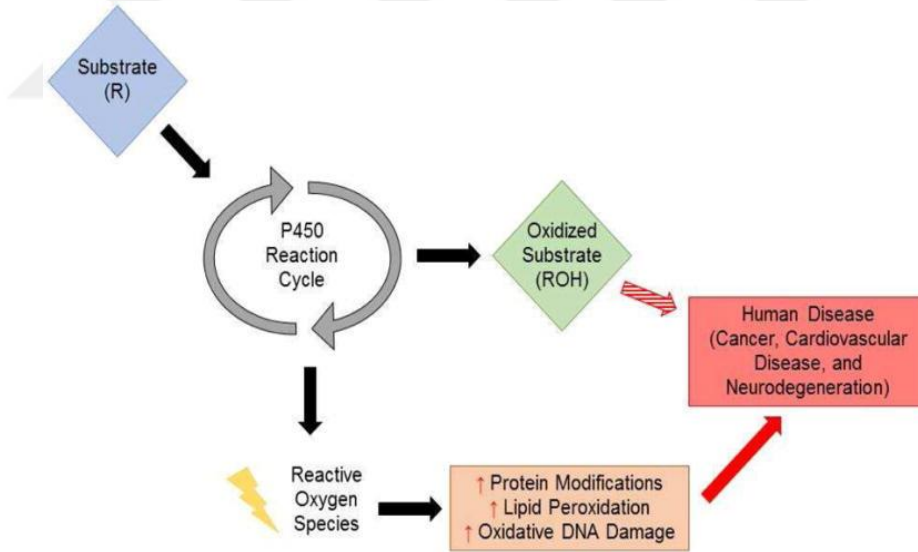
CYP450, tüm biyolojik krallıklara dağılmış 15.000'den fazla bilinen gen ile yapısal olarak çeşitli ve fonksiyonel olarak çok yönlü hem içeren enzimlerin bir süper ailesini oluşturur. CYP450 proteinleri çok çeşitli birincil dizilere sahiptir ve amino asit dizisi kimliklerine bağlı olarak aileler halinde gruplandırılır (11).

İnsan genomunda 57 geni kodlayan 18 memeli sitokrom CYP450 familyası vardır. CYP2, CYP3 ve CYP4 aileleri diğer 15 aileden çok daha fazla gen içerir; bu üç aile aynı zamanda kemirgen genomlarında önemli ölçüde daha büyük ailelerdir. CYP1, CYP2, CYP3 ve CYP4 familyalarındaki genlerin çoğu eikosanoid metabolizmasında yer alan enzimleri kodlar ve çeşitli çevresel uyanlarla (yani diyet, kimyasal indükleyiciler, ilaçlar, feromonlar vb.) Genellikle tek bir üyeye sahiptir ve nadirdir. CYP2 olmasına rağmen ve CYP3 familyaları büyük ölçüde gereksiz ve karışık olarak kabul edilebilir, geri kalan 16 gen ailesinin bir veya daha fazla genindeki aynı alt

familyada (CYP1A1, CYP1A2 vb.) mutasyonlar veya diğer kusurlar öncelikle CYP450'ye özgü hastalıklardan sorumlu olanlardır (12).

### 2.3. CYP450 ile Reaktif Oksijen Türleri Üretimi

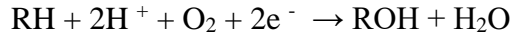
CYP450 enzimleri, reaksiyon döngüleri boyunca hücreSEL ROT'a katkıda bulunan çeşitli bir hema monoksijenaz grubudur. CYP450 enzimleri insan fizyolojisinde çok önemli bir rol oynar. İlaç ve ksenobiyotik metabolizmasının yanı sıra endojen moleküllerin biyosentezinde yer alır ve insan vücudunda ifade edilir. Bununla birlikte, CYP450 katalitik döngüsü sırasında, enzimatik döngünün ayrılması yoluyla ROT üretir. ROT'un, hücre hasarına ve ölüme yol açabilen ve hastalık gelişimine katkıda bulunabilen lipitler, proteinler ve nükleik asitleri içeren endojen molekülleri değiştirdiği bilinmektedir. ROT, kanser ve yaşlanma da dahil olmak üzere çok çeşitli hastalık ve koşullarda rol oynamaktadır (13).



**Şekil 2.1:** CYP450'lerin ROT aracılı insan hastalıklarına katkıda bulunduğu mekanizma

(14)

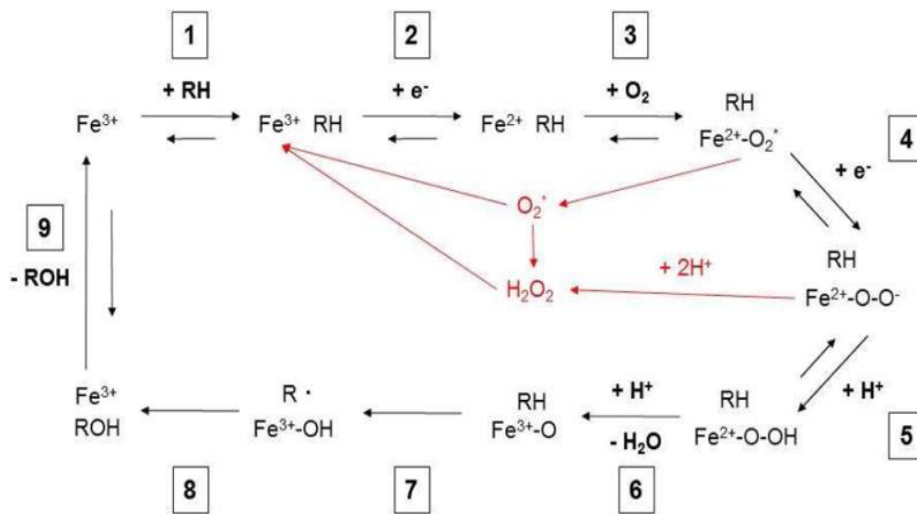
CYP450 enzimleri, çok çeşitli reaksiyonlar yürütebilmesine rağmen, en yaygın olanı bir substratın (R) oksidasyonudur ve genel reaksiyon mekanizması şu şekildedir (13):



### 2.3.1. Sitokrom P450 enzimatik döngüsü

CYP450 enzimleri çok çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar için çok yönlü katalizörlerdir, ancak genellikle substrat oksidasyonundaki rolleri ile bilinirler. Oksidasyon kapasiteleri nedeniyle CYP450 enzimleri, ilaçların ve ksenobiyotiklerin faz I metabolizmasında önemli bir rol oynar, substratın polaritesini artırır ve atılıma yardımcı olur (15).

Reaksiyon döngüsü bilgisi CYP450 enzimlerinin nasıl ROT üretebileceğini ve oksidatif stresi artırabileceğini anlamada önemli bir rol oynamaktadır. Reaksiyondaki ilk adım, substratın (R-H) hem-tiyolat grubunun ferrik demirine ( $\text{Fe}^{3+}$ ) bağlanmasıdır. Hem-tiyolat grubunun demiri daha sonra NADPH sitokrom P450 redüktaz ile bir elektron indirgemesi yoluyla  $\text{Fe}^{3+}$  'dan  $\text{Fe}^{2+}$  'ya indirgenir. Bu, oksijenin ( $\text{O}_2$ ) demire bağlanmasını kolaylaştırır. Sitokrom P450 redüktaz daha sonra ikinci bir seçim ilavesiyle  $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$  kompleksini azaltır ve kompleks içindeki oksijeni ( $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ ) aktive eder. İki protonun ( $\text{H}^+$ ) eklenmesi O-O bağınyı ayırır ve  $\text{H}_2\text{O}$  serbest bırakır.  $\text{FeO}^{3+}$  kompleksi daha sonra reaktif bir ara madde olan  $\text{RFe}^{3+}\text{.OH}^-$  bırakarak substrattan (R) bir proton çıkarır. Hidroksil grubu daha sonra substrat radikaline aktarılır ve daha sonra oksitlenmiş substrat daha sonra serbest bırakılır (13).



Şekil 2.2: CYP450 Reaksiyon Mekanizması (13)

## **2.4. CYP450 enzimlerinin insan hastalıklarındaki rolü**

1970'ler ve 1980'ler boyunca pek çok organizmada (bitkiler dahil) görünüşte ilgisiz çeşitli yaşam süreçleriyle ilişkili sitokrom CYP450 raporlarının sayısındaki artışla birlikte sitokrom CYP450 enzimlerinin hemen hemen tüm sentezi ve bozunmasında önemli olduğu öne sürüldü. 1980'ler boyunca, ilaçların genellikle bitkilerden türetildiği ve bitki metabolitlerinin memeli CYP450 enzimlerinin substratları olduğu ve CYP450 genlerinin merkezi bir rol oynadığı takdir edildi. Kritik bir yaşam işlevi ile ilişkili diğer birçok gen ve enzimde olduğu gibi, bu gendeki belirli mutasyonlar veya diğer değişiklikler ve dolayısıyla gen ürünü patolojiye neden olacaktır. Dahası, gereğinden fazla gen ürünü yoksa, ciddi hastalık riski çok daha yüksektir (12).

## **2.5. Konjenital Adrenal Hiperplazi**

KAH, kortizol biyosentezi için steroidojenik yola dahil olan birkaç enzimden birinin eksikliğinden kaynaklanan bir grup otozomal resesif bozukluktur (16).

KAH, birkaç steroidojenik enzimden birinde tam veya kısmi aktivite kaybından kaynaklanır. Tüm KAH vakalarının %95'ine kadarı, kortizol ve aldosteron üretimini azaltan ve adrenal androjenlerin aşırı üretimine yol açabilen CYP21A2 eksikliğinden kaynaklanmaktadır (17).

### **2.5.1.Epidemiyoloji**

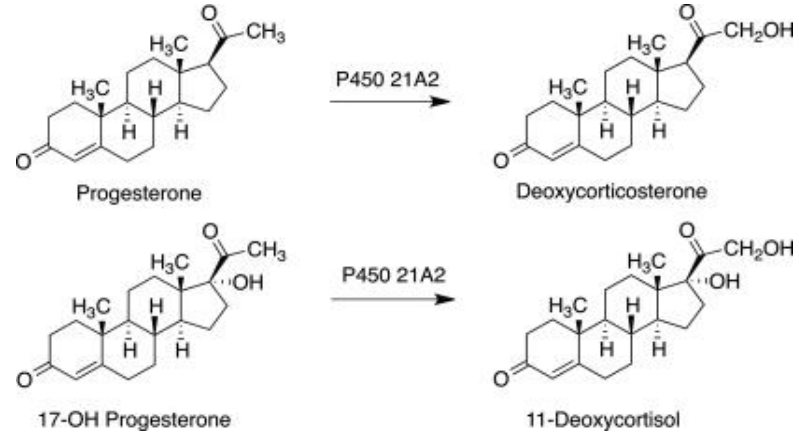
Dünya çapında 6,5 milyona yakın yenidoğan taramasından elde edilen veriler, klasik KAH'ın 1:13,000 ila 1:15,000 canlı doğumda gerçekleştiğini göstermektedir (18). Klasik olmayan 21-hidroksilaz eksikliği muhtemelen erkeklerde en sık görülen otozomal resesif genetik bozukluktur ve özellikle Aşkenazi Yahudileri, Hispanikler, İtalyanlar ve Yugoslavlar'da sık görülür. Aşkenazi Yahudilerinde hastalık prevalansı %3.7; Hispanik'te %1.9; Yugoslavlar'da %1.6; İtalyanlarda %0.3 ve çeşitli Kafkas nüfusunda %0.1'dir. Hastaların %75'inde tuz kaybına neden olan fenotip olduğu tahmin edilmektedir (18,19).

### **2.5.2. Genetik**

Bugüne kadar 200'den fazla CYP21A2 mutasyonu rapor edilmiştir. Oysa bildirilen mutasyonların çok sayıda rağmen yaklaşık 10 mutasyon etkilenen allellerin çoğunluğundan sorumludur. Çoğu mutasyon, gen dönüşüm olaylarından kaynaklanır. Gen dönüşüm olayları mayoz bölünme sırasında fonksiyonel gen ve psödojen arasındaki homolog rekombinasyon baz eşleşmesinde bir uyumsuzluğa yol açtığında gerçekleşir. Bu işlem sırasında fonksiyonel gen zararlı CYP21A1P elde edebilir. CYP21A1P geninin bir kısmı CYP21A2 geninin bir kısmına kaynaşmıştır. En çok etkilenen bireyler, her alel üzerinde farklı mutasyonlara sahip bileşik heterozigotlardır. Mutasyonlar, tam işlev kaybından hafif kayıplı mutasyonlara kadar değişir. İn vitro 21-hidroksilaz aktivitesi tahminleri, tuz kaybına neden olan KAH ile ilişkili mutasyonlar için <math>\leq 1\%</math>den, basit virilize edici KAH için %2-10 ve NKAH için %30-50 aralığındadır (20).

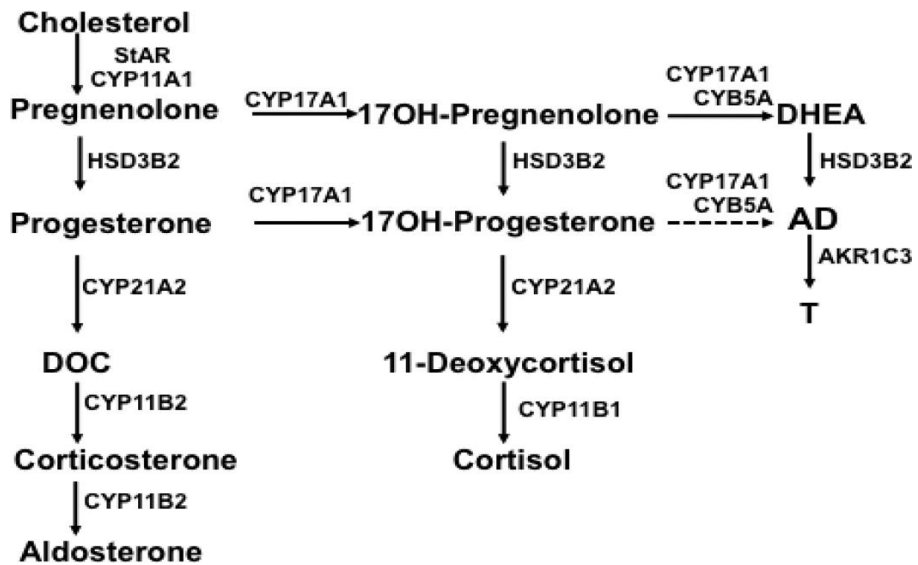
### **2.5.2. Patofizyolojisi**

CYP21A2 sırasıyla progesteron ve 17-hidroksiprogesteronu, 11-deoksikortikosteron ve 11-deoksikortizole dönüştürür (Şekil 2.3). CYP21A2 adrenal kortekste ifade edilir, aldosteron ve kortizolün biyosentezinde önemli bir rol oynar. Kortizol, glisemik kontrol ve strese yanıt için gerekli olan ana insan glukokortikoididir; aldosteron ise tuz dengesini ve vücut sıvı hacmini kontrol eden başlıca insan mineralokortikoididir. CYP21A2'deki mutasyonlar, steroidogenez yolunda CYP11A1'in aşağı akışındaki enzimlerin kusurlarından kaynaklanan otozomal resesif hastalıklar ailesi olan KAH'a yol açar. KAH semptomları, hangi steroidojenik CYP450'nin azalmış aktiviteye sahip olduğuna bağlı olarak değişir (4). İnsanlarda steroid hormonlarının sentezi ile ilişkili altı CYP proteini (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, CYP19A1 ve CYP21A2) vardır. CYP11A1, CYP11B1 ve CYP11B2, iç mitokondriyal zarda bulunur ve CYP21A2 dahil olmak üzere diğer CYP proteinleri mikrozomal monoksijenazlardır (17).



Şekil 2.3: CYP21A2 tarafından katalize edilen reaksiyonlar (17)

CYP11B1 (steroid 11 $\beta$ -hidroksilaz) ve CYP11B2 (aldosteron sentaz), her biri 11 $\beta$ -hidroksilaz aktivitesine sahip iki insan mitokondriyal CYP450'dir ve sırasıyla kortizol ve aldosteron biyosentezi için gereklidir. Her ikisi de adrenal kortekste ifade edilir, 11-deoksikortizol CYP11B1 için substrattır ve 11-deoksikortikosteron CYP11B2 için olur. 11 $\beta$ -hidroksilaz aktivitesine ek olarak, CYP11B2 ayrıca 18-hidroksilaz ve 18-oksidadz aktivitelerini katalize ederek aldosteron üretimine yol açar. Bu iki proteini kodlayan genler, kromozom 8'de birbirine yakındır ve her iki aktivitede de kusurlar, eşitsiz geçişlerinden kaynaklanır, hipertansiyon ve diğer semptomlarda ortaya çıkan glukokortikoid ile iyileştirilebilir aldosteronizme yol açar (4).



Şekil 2.4: Adrenal steroid hormon sentezinin yolları (21)

KAH, kortizol sentezinde kalıtsal enzimatik eksiklikler için bir şemsiye terimdir. Arızalı kortizol üretimi, hipotalamus ve hipofiz bezine negatif geri beslemeyi hafifleterek sırasıyla CRH ve ACTH aşırı salgılanmasına neden olur. Yükseltilmiş ACTH, kortizol sentezindeki bloğun üstesinden gelemez, ancak trofik etkisi adrenal bezlerin genişlemesine yol açar. Tüm KAH formlarındaki enzimatik kusurlar tam veya kısmi olabilir, bu da geniş bir klinik sunum yelpazesine yol açar. En şiddetli biçimlere geleneksel olarak klasik KAH denir ve tanınması en kolay olanlardır. Tersine, daha hafif formların veya klasik olmayan KAH'ın teşhis edilmesi genellikle zordur veya özellikleri, birbirleriyle ve diğer klinik varlıklar ile çakıştığından göz ardı edilebilir (22).

### **2.5.3. Klinik Bulgular**

KAH yaklaşık 14.000 canlı doğumdan birinde meydana gelir ve basit virilizasyon ve tuz kaybı formlarından oluşur. Her ikisi de fetal adrenal androjen hiper üretimi ile dışı dış genital virilizasyonu ve ciddi şekilde bozulmuş glukokortikoid ve mineralokortikoid sekresyonunu içerir. Klasik olmayan formda mineralokortikoid sekresyonu korunur ve uterusda dışı virilizasyon yok; androjen fazlalığına bağlı fenotipik belirtiler değişkendir. Basit virilizasyon daha geç çocuklukta veya hirsutizm, adet düzensizliği ve azalan doğurganlık için başvuran yetişkin kadınlarda görülür. Erkekler genellikle asemptomatiktir, bu hafif KAH formunun insidansını değerlendirmenin zorluğunun altındadır (23).

#### **2.5.3.1. Tuz kaybettiren 21-hidroksilaz eksikliği**

Klasik KAH hastalarının yaklaşık dörtte üçü, progesteronun ciddi şekilde bozulmuş 21-hidroksilasyonu nedeniyle yeterli miktarda aldosteron sentezleyemez. Aldosteron normal sodyum homeostazı için gereklidir. Bu hormonun eksikliği böbrek, kolon ve ter bezleri yoluyla sodyum kaybına neden olur (24).

21-hidroksilaz eksikliği şiddetli olduğunda, adrenal aldosteron sekresyonu distal renal tübüllerin sodyum tarafından emilmesi için yeterli değildir ve bireyler tuz kaybı, kortizol eksikliği ve androjen fazlalığından muzdariptir. Böbrek tuzu israfı olan bebeklerde beslenme yetersizliği, kilo kaybı, gelişememe, kusma, dehidrasyon, hipotansiyon, hiponatremi ve adrenal krize ilerleyen hiperkalemik metabolik asidoz

(azotemi, vasküler çöküş, şok ve ölüm) vardır. Adrenal kriz bir ila dört hafta arasında ortaya çıkabilir. Tuz kaybının, başta aldosteron olmak üzere, tuz tutucu steroidlerin yetersiz salgılanmasından kaynaklandığı varsayılmaktadır. Ek olarak, 21-hidroksilaz enziminin hormonal öncüleri, olgunlaşmamış yenidoğan böbrek tübülünün sodyum koruyucu mekanizmasında mineralokortikoid etkisine karşı antagonistler olarak hareket edebilir (18,25).

### **2.5.3.2.Basit virilize edici 21-hidroksilaz eksikliği**

Klasik basit virilizasyon 21-hidroksilazın göze çarpan özellikleri, hızlı somatik büyüme ve erken epifiz kapanmasına ve muhtemelen kısa boyuta yol açan gelişmiş epifiz olgunlaşması ile doğum öncesi virilizasyon ve progresif doğum sonrası erkekliktir. Bu bozuklukta genellikle mineralokortikoid eksikliğine dair bir kanıt yoktur.

Basit virilize KAH'lı bir kadının doğumunda tanı genellikle görünen genital belirsizlik nedeniyle hemen yapılır. Dış genital bölgeler yenidoğan erkeklerde, hiperpigmentasyonda belirsiz olmadığından, ACTH sekresyonunun ve kortizol eksikliğinin arttığını gösteren tek ipucu küçük testisli büyük bir penis olabilir. Erkeklerde doğumda tanı, doğum öncesi veya yenidoğan taramasına dayanır. Bir kadın doğum sonrası erken glukokortikoid replasman tedavisi ile tedavi edilmezse, genital organları, aşırı adrenal androjenlerin devam etmesi nedeniyle virilleşmeye devam edebilir ve yalancı erken ergenlik görülebilir. Tuz kaybettiren 21-hidroksilaz hastalarında, KAH'dan etkilenen çocuklarda hiperandrojenizm belirtileri arasında yüz, aksiller ve kasık kıllarının erken başlangıcı, yetişkin vücut kokusu ve hızlı somatik büyüme ve kemik yaşı ilerlemesi, yetişkinlikte kısa boya yol açar. Ergenlik, doğurganlık, davranış ve biliş ile ilgili yukarıda tartışılanla aynı konular, basit virilize 21-hidroksilazlı hastalar için geçerlidir (18).

### **2.5.3.3.Klasik olmayan 21-hidroksilaz eksikliği**

Klasik olmayan 21-hidroksilaz eksikliği, 21-hidroksilasyonun kısmi eksikliklerinin geç başlangıca, daha az aşırı hiperandrojenizme ve daha hafif klinik semptomlara veya hiç semptom belirtmesine izin verdiği durumu ifade eder. Bununla birlikte, NKAH formları klasik formların alellik varyantlarıdır.

Semptomatik formlar: Bunlar, doğum öncesi virilizasyonun olmaması (normal vajinal ve üretral delikler ve tanı anında labial füzyon olmaması) ve hafif klitoral genişlemenin doğum sonrası başlangıcı gibi hafif androjen fazlalık semptomlarının ortaya çıkması dışında çocukluk boyunca olaysız seyir ile tanımlanır. Özellikle peri-pubertal dönemde kadınlarda spesifik olmayan hiperandrojenizm ve her iki cinsiyetteki çocuklarda daha nadiren yalancı erken ergenlik olarak ifade edilirler. Klinik belirtiler (erken puberte, uzun boylu ve ileri kemik yaşı, adet bozuklukları, infertilite, yavaş ilerleyen hirsutizm, akne) daha sonraki çocukluk, ergenlik veya ergenlik sonrası ortaya çıkar. En fazla bir klitoromegali gözlenir, ancak bazı durumlarda labia minoranın füzyonunun varlığı, çocuklukta teşhis edilen bir tuz kaybettiren formu ile oldukça erken başlangıçlı bir klasik olmayan formu arasındaki sınır çizgisini ayırt etmenin zorluğunu gösterir. Aslında KAH ailelerinin genetik ve hormonal çalışmaları ve 17-OHP ölçümlerinin ortak kullanımı, bu formların tanı yaşını geri aldıklarında bu zorlukları arttırmaktadır.

Asemtomatik formlar: Tanı genellikle klasik 21-hidroksilaz eksikliği olan ailelerin genotiplenmesi ve hormonal testi sırasında konur. Akrabalar, klasik olmayan semptomatik formu olan, ancak semptom olmayan hastalar ile aynı biyokimyasal profilleri sunar. Bu asemtomatik formlara kriptomatik formlar denir. Aynı ailede fenotipik görünüm varyasyonları, CYP21A2 gen mutasyonları dışındaki mekanizmalara bağlı olabilir. Klinik ekspresyondaki değişkenliği açıklarken diğer faktörler de dikkate alınmalıdır. Bu hastalar daha az adrenal androjen üretebilir veya cilt gibi hedef dokularda inaktif androjen aktivitesine sahip olabilir. Androjen Reseptörünün (AR) duyarlılığının artmasının, ergenlik döneminde büyüme büyümesinin zayıflamasını ve hızla ilerleyen kemik yaşını açıklayabileceği ileri sürülmüştür. Bununla birlikte hem KAH hem de AR gen mutasyonu ile başvuran bir ailenin gözlemlenmesi, AR geni mutasyonlarının veya polimorfizmlerinin, KAH kızları tarafından gösterilen hiperandrojenik semptomların derecesini etkileyen yaygın bir faktör olmadığını göstermektedir. Hafif 21-hidroksilaz eksikliği semptomlarının stres derecesine bağlı olarak CRH- $\text{ACTH}$  salımı için değişken uyaranlar sağlamak da mümkündür (26).

## 2.6. Prolidaz

Prolidaz (EC 3.4.13.9), imidodipeptidleri C-terminal prolin veya hidroksprolin ile spesifik olarak ayıran bir sitosolik imidodipeptidazdır (27). İmmidodipeptidlerin çoğu kollajen bozunma ürünlerinden türetilir. Enzim, kollajen resentezi ve hücre büyümesi için imidodipeptidlerden prolin geri dönüşümünde önemli bir rol oynar (28).

Doğada çok sayıda peptidaz vardır, ancak prolidazdan önceki peptit bağlarını parçalayabilen çok az sayıda vardır. Prolidaz, ökaryotlarda Xaa-Pro (Xaa: herhangi bir hidrofobik amino asit) dipeptidlerinin hidrolizini katalizleyen bilinen tek metaloenzimdir. İnsan prolidazı için, tercih edilen dipeptit substratı Glisin-Prolin'dir (GlyPro), ancak diğer Xaa-Pro (Xaa: Alanin (Ala), Metiyonin (Met), Fenilalanin (Phe), Valin (Val) veya Lösin (Leu)) dipeptitleri de kullanılabilir. İnsan prolidazında fizyolojik olarak ilgili metal iyonları Mangan'dır ( $Mn^{2+}$ ), ancak aralarında Magnezyum ( $Mg^{2+}$ ) olmak üzere diğer iki değerlikli iyonların varlığında bir miktar artışta aktivite bildirilmiştir (29).

### 2.6.1. Prolidaz Geni

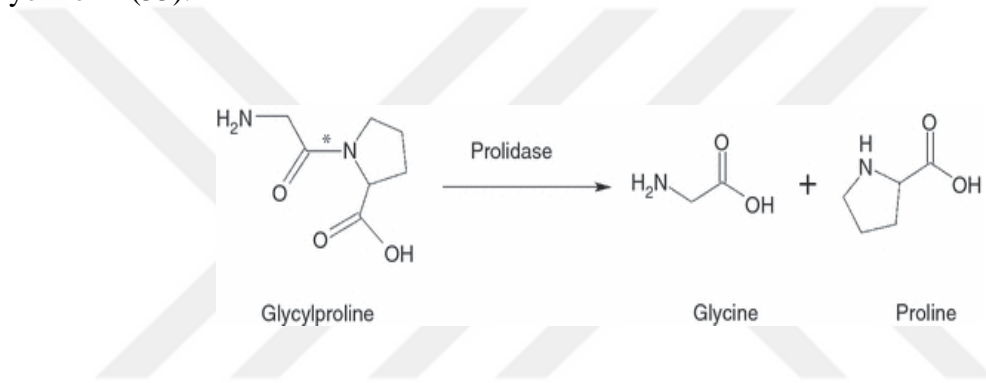
Prolidaz geni (PEPD) molekül ağırlığı 54 kDa olan amino asitlerin 493 bir polipeptidi kodlayan 15 ekson ihtiva kromozom 19 üzerinde yer almaktadır. İki özdeş alt birimi olan bir dimerdir. İnsanlarda, PDI ve PDII olmak üzere iki prolidaz izoformu mevcuttur. İsimli polimorfizmler, protein yapısına amino asit değişimi ekleyen nokta mutasyonlarıdır. Birincil amino asit sekansı, olgun protein yapısından ve proteinin fonksiyonundan sorumlu faktörlerden biridir. Gen ekspresyonu ve transkripsiyon sonrası modifikasyonlar, prolidazın fizyolojik seviyesini değiştirme potansiyeline sahip olabilir (30).

### 2.6.2. Prolidazın Genel Özellikleri

Prolidazlar, katalizin meydana gelmesi için bir metal kofaktörün aktif bölgeye yakın bağlanmasını gerektiren metallopeptidazlardır. Daha spesifik olarak, prolidaz için tam aktivite için iki metal iyonunun (bir dinükleer metal merkezi) doluluk oranına ihtiyaç duyulurken, metiyonin aminopeptidaz (MetAP) gibi diğer metallopeptidazlar aktivite için sadece bir metal iyonu kullanır ve diğer metal iyonu aktivite modülasyonuna katılır

(31). İki değerlikli metal kasyonlarının varlığı, enzimi stabilize etmeye ve substratın bağlanma cebine sabitlenmesine yardımcı olur. Kristal yapı analizi, çeşitli prolidazlarda tespit edilen metal bağlanması için önemli beş korunmuş amino asidi ortaya çıkarmıştır (7,32).

Şekil 2.5, prolin ve glisin arasındaki etkilenen bağı vurgulandığı genel prolidaz reaksiyonunu gösterir. Substrat aktif bölgeye bağlandıktan sonra, reaksiyon makas bağı üzerindeki metal merkezle ilişkili bir hidroksit grubundan bir nükleofilik saldırı ile başlatılır. Protonlar, prolin ve Xaa kalıntısı arasındaki amid bağının yarılmasına izin veren bir proton mekiği görevi gören korunmuş bir glutamat kalıntısı tarafından kaydırılır. Serbest prolin serbest bırakıldıktan sonra prolidaz aktif bölgesi tamamen yenilenir (33).



**Şekil 2.5:** Amid bağının vurgulandığı dipeptit Gly-Pro'yu içeren prolidaz reaksiyonu  
(34)

Prolidazlar substrat spesifiklikleri, metal gereksinimleri, doğal yapı ve kataliz için optimum sıcaklık bakımından büyük farklılıklar gösterir; bununla birlikte, hepsinin göreceli olarak dar bir pH aralığı olan 6-8 aralığında çalıştığı görülmekte olup, optimal pH başlangıç türlerine bağlıdır. Kataliz için optimum sıcaklıklar, mezofilik kaynaklardan elde edilen prolidazlar için 35-55°C aralığındadır. Prolidazlar hidrolize ettikleri substrat tipinde oldukça spesifik olmakla birlikte, prolidazlar arasında dipeptit substrat spesifikliklerinde farklılıklar vardır. Ala-Pro, Met-Pro, Phe-Pro, Leu-Pro ve Val-Pro ile aktif olmasına rağmen, insan prolidaz Gly-Lys-Pro ile en yüksek aktiviteyi gösterir (35).

### 2.6.2. Prolidazın Kollajen Metabolizmasındaki Önemi

Kollajenler omurgalılarda en bol hücre dışı matris proteinleridir. Üç kolajen  $\alpha$  zincirinden oluşan karakteristik bir üçlü sarmal yapıya sahiptirler. Kollajen  $\alpha$  zincirinin birincil yapısı, kollajen üçlü sarmalın oluşumunu sağlar. Özellikle Glisinin her üçüncü tortudaki yeri ve posttranslasyonel olarak hidroksillenmiş Prolin ve Lizin tortularının varlığı kritik faktörlerdir (36). Bir kollajen  $\alpha$  zincirinin birincil yapısı genellikle glisinin her üç tortu olduğunu gösteren -X-Y-Gly- olarak tanımlanırken, X ve Y pozisyonlarında herhangi bir amino asit olabilir. Bu modifikasyon, kollajen üçlü sarmal oluşumundan önce endoplazmik retikulumda gerçekleşir (37).

Bakteriyel proteolitik sistemlerde, proteinin daha küçük peptitlere parçalandığı protein bozulmasının ilk aşamaları için geniş spesifikliğe sahip peptidazlar gereklidir. Prolin siklik yapısı ve bir peptit zincirindeki varlığı ve konumu, biyolojik olarak aktif peptitleri proteolizden koruyabilir, çünkü prolin ve başka bir amino asit arasındaki bağı hidrolize edebilen sadece birkaç peptidaz vardır. Prolin içeren peptitleri parçalayabilen hem prolin hem de substrata özgü yüksek enzim sınıfının bu biyolojik olarak aktif peptitleri düzenlemenin bir yolu olabileceği öne sürülmüştür (7,31).

Prolidaz, ürün olarak serbest prolin üretmek için prolin içeren dipeptitleri parçalayabilen bilinen tek enzimdir. Prolidazın insanlarda birincil fizyolojik rolü biraz daha iyi anlaşılmıştır. Protein katabolizması sırasında prolidaz, prolin içeren dipeptidlerin sitoplazmaya serbest prolin salgıladığı hidrolize olduğu hücre içi kollajen, prokollajen ve diğer prolin içeren peptitlerin degradasyonunun son aşamasını katalize eder (38). Prolin bir stres substratı olarak işlev görür ve metabolik sinyale katılabilir. Kollajen yıkımı tipik olarak doku hasarı sırasında kan akışından ödün verilmesi gibi metabolik stres koşulları sırasında ortaya çıkar. Prolidazın yeni kollajenin oluşma oranında adımı sınırlayıcı bir faktör olabileceğini gösteren kolajen biyosentezi için serbest prolin de gereklidir (39).

Kollajen, bağ dokusunun korunması için kritiktir ve vücuttaki en bol proteindir. Prolin ve hidroksiprolin, kollajen içindeki amino asit kalıntılarının %25'ini oluşturur. Kollajen yıkımı, endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar tarafından tripeptitlere ve dipeptitlere ayrılan daha küçük proteinler ve peptitler ile sonuçlanan matris metaloproteinazların aktivasyonu ile başlatılır (40). Endopeptidazlar peptit zinciri içindeki bağları parçalarken, ekzopeptidazlar amino asit kalıntılarını N ve C terminallerinden ayırır. Bu

nedenle prolidaz, hücre dışı matris devirinde kritik bir adımda önemli işlevlere sahiptir (39,40).

### **2.6.3. Prolidaz'ın Hastalıklarla İlişkisi**

Prolidaz eksikliği nadir görülen resesif bir hastalıktır ve tahmini insidansı 1 milyon doğumda 1-2'dir (41). Klinik olarak bu hastalar, hafif ila şiddetli arasında değişen bir dizi kronik semptomla başvururlar. Fenotipik belirtiler çeşitlidir ve cilt ülserasyonlar zeka geriliği, splenomegali, tekrarlayan enfeksiyonlar, fotosensitivite, hiperkeratoz ve sıradışı yüz görünümünü içerebilir (7,42). Başlıca bir özellik, özellikle alt ekstremitelerde cildin kronik inatçı ülserasyonudur. Hastalığın başlangıç yaşı doğumdan 22 yaşına kadar değişmekle birlikte, bazı vakalar asemptomatik kalmaktadır (41). Tipik olarak prolidaz hastalarında erken çocukluk döneminde yetişkinliğe doğru ilerleyen semptomlar gelişir; bununla birlikte, bazı geç başlangıçlı vakalar da bildirilmiştir (43).

Prolidaz aktivitesinin eksikliği büyük imidopeptidüriye yol açar. İdrarda imidodipeptitlerin saptanması için çeşitli teşhis teknikleri geliştirilmiştir. Ancak tanının doğrulanması, kültürde eritrositlerde, lökositlerde veya fibroblastlarda prolidaz aktivitesinin ölçülmesini ve / veya PEPD geninin sekans analizini gerektirir (41).

Sistemik Lupus Eritematozus (SLE), kan damarlarının ve bağ dokularının yaygın inflamasyonu ile karakterize çok sistemli bir otoimmün hastalıktır ve prolidaz eksikliği arasında bir ilişki bildirilmiştir. Hem prolidaz eksikliği hem de SLE, bağışıklık fonksiyonundaki bozukluklarla ilişkilidir ve ortak birçok klinik özelliğe sahiptir. Çok değişken klinik bulgulara ve spesifik otoantikörlere sahiptir. Yetişkinlerde tahmini SLE prevalansı 100.000 birey başına 12-50'dir. SLE vakalarının yaklaşık %15-20'si 16 yaşından önce ortaya çıkar. SLE başlangıcı 5 yaşından önce nadirdir. Pediatrik SLE genellikle daha agresif hastalık ve daha kötü prognoz ile sonuçlanır (41).

Prolidaz eksikliği hastalarında mevcut olan semptomların birçoğunun anjiyopatik olması, prolidazın anjiyojenik sinyallemede önemli bir rol oynayabileceğinin bir göstergesidir. Anjiyogenez veya mevcut damarlardan yeni kan damarlarının büyümesi, yara iyileşmesinde normal bir süreçtir; bununla birlikte, bir tümörün uyku halinden invaziv bir maligniteye dönüşmesinde de temel bir adımdır (38).

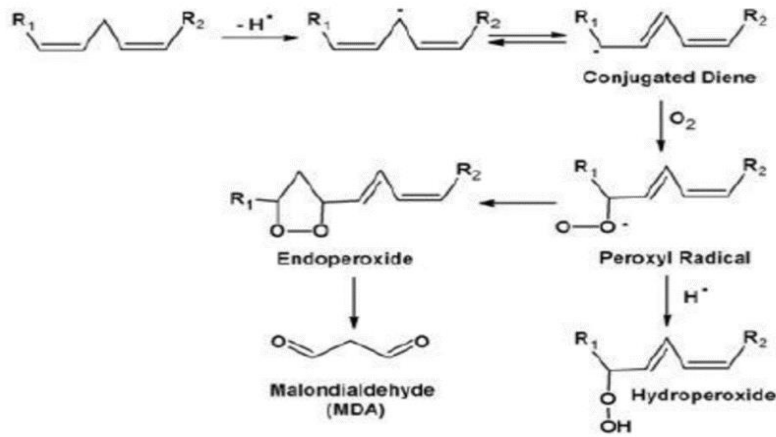
Prolidaz aktivitesindeki değişiklikler birçok hastalık ve kanserde belgelenmiştir. Prolidaz aktivitesindeki bir artış veya azalma sadece bir hastalık durumunun varlığını değil, aynı zamanda durumun ilerlemesini de gösterebilir (7). Meme kanseri, endometriyal kanser, akciğer kanseri ve melanom gibi çeşitli kanserlerde prolidaz aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (44).

Diğer bazı bozukluklar aşırı kollajen döngüsü ile karakterize edilir ve bu nedenle artan prolidaz aktivitesi seviyeleri gösterir. Her iki hipertansiyon ve erektil disfonksiyon olarak, (bir hastalığı karakterize yan etkilere neden olan) kan damarlarında artan kollajen birikimi yükselmiş serum prolidaz aktivite seviyeleri ile gösterilebilir (45,46).

## 2.7. Malondialdehit

Malondialdehit (MDA), sekonder lipit oksidasyonu sırasında üretilen en bol aldehidlerden biridir ve muhtemelen en yaygın olarak oksidasyon markörü olarak kullanılır. MDA birçok durumda gıdalardaki lipit peroksidasyonundan kaynaklanan en bol bireysel aldehittir (47).

Lipid peroksidasyonu insanda iyi bilinen bir hücrel hasar mekanizmasıdır ve hücreler ve dokulardaki oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılır (48). Lipid peroksidasyonunun ana birincil ürünleri lipit hidroperoksitlerdir (LOOH). Lipid peroksidasyonu sırasında ikincil ürünler olarak oluşturulabilen birçok farklı aldehid kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (49). Çoklu doymamış yağ asitlerinden türetilen lipit peroksitler kararsızdır ve karmaşık bir bileşik serisi oluşturmak için ayrışabilir. Bunlar arasında en bol MDA olan reaktif karbonil bileşiği bulunur (48).



Şekil 2.6: Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA (50)

Özellikle, MDA'nın yüksek reaktivitesi ve proteinler veya DNA gibi çoklu biyolojik moleküller içeren eklentiler oluşturma kapasitesi son on yılda büyük ilgi görmüştür. MDA'nın yüksek reaktivitesi esas olarak elektrofilikliğine dayanır ve bu da onu temel amino asit kalıntıları (Lizin ve Histidin) gibi nükleofillere karşı güçlü bir şekilde reaktif hale getirir. Bu reaktivite sadece MDA'nın aldehidik doğasına dayanmaz, aynı zamanda mezomerik olarak stabilize edilmiş Schiff bazlarının oluşturulmasını mümkün kılan 1,3-dialdehidik yapısından da etkilenir. Ayrıca, MDA'nın yüksek reaktivitesi, proteomik çalışmalarında bazik amino asitlerin kontrollü modifikasyonu için de kullanılmıştır. Bununla birlikte, sadece yaşam bilimleri alanında değil, gıda analizinde de MDA, lipid oksidasyonunun (oksidatif ayrışma) bir biyobelirteçidir. MDA'nın potansiyel mutajenitesi, aterojenitesi ve kanserojenitesi bu maddenin izlenmesinin önemini vurgulamaktadır. Birlikte ele alındığında, bu gerçekler MDA'nın çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif ayrışması için bir biyobelirteç olmadığını, bunun yerine diğer kaynaklardan da türetilebileceğini ve daha da önemlisi DNA ve protein eklentileri oluşturabildiği için fizyolojik uygunluğu gösterdiğini göstermektedir (51).

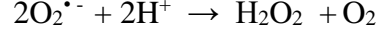
## 2.8. Süperoksit Dismutaz

Oksijen yaşam için vazgeçilmez bir elementtir. Hücreler enerji üretmek için oksijen kullandıklarında, mitokondri tarafından ATP üretiminin bir sonucu olarak serbest radikaller oluşur. Bu yan ürünler genellikle hücrel redoks işleminden kaynaklanan ROT ve reaktif azot türleridir (RAT) (52).

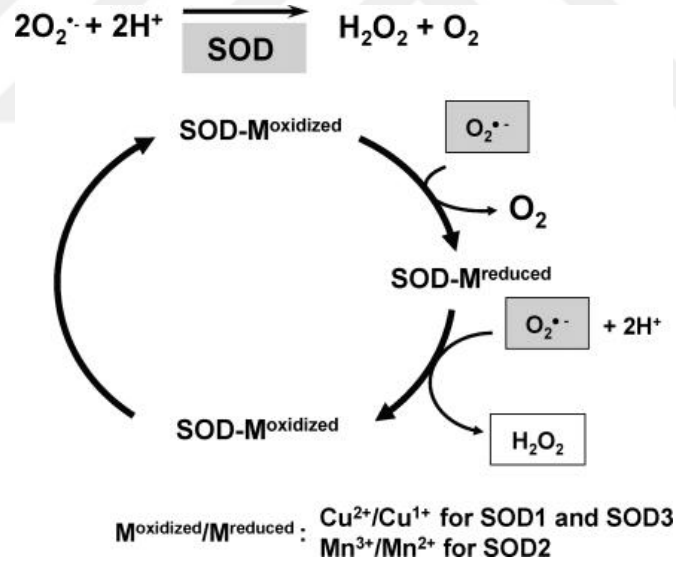
ROT ve RAT, oksijen atomu veya bunların eşdeğerleri ile ilişkili ve oksijen yerine diğer moleküller ile daha güçlü reaktiviteye sahip serbest radikallerdir. Genel olarak ROT / RAT, hücrel metabolizma ve iyonlaştırıcı radyasyonun yan ürünleri olarak üretilir ve genellikle şu dört türü gösterir: süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) ve tekli oksijen ( $^1O_2$ ). Diğer biyolojik olarak önemli serbest radikaller vardır. Bunlar membran lipitleri ile ilişkili lipit hidroperoksit (ROOH), lipit peroksil radikali ( $ROO^{\cdot}$ ) ve lipit alkoksil radikali ( $RO^{\cdot}$ ); reaktif azot türleri olan nitrik oksit ( $NO^{\cdot}$ ), azot dioksit ( $NO_2^{\cdot}$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot}$ ); ve kükürt atomu üzerinde eşleştirilmemiş bir elektrona sahip tiyol radikalidir (RS) (53).

SOD, yaşamın tüm krallıklarında bulunan bir grup metaloenzimdir. SOD'lar ROT aracılı yaralanmalara karşı ön savunma hattını oluşturur. Bu proteinler süperoksit anyon

serbest radikalinin moleküler oksijene ve hidrojen peroksite olan dismutasyonunu katalize eder ve bu da hücrelere aşırı konsantrasyonda zarar verir (54).



Memelilerde üç SOD izoformu (SOD1 [CuZnSOD]; SOD2 [MnSOD]; SOD3 [ecSOD]) vardır ve her biri farklı genlerin ve farklı hücre altı lokalizasyonunun bir ürünüdür, ancak aynı reaksiyonu katalize eder. Bu SOD izoformlarının bu farklı hücre altı konumu, bölümlere ayrılmış redoks sinyali için özellikle önemlidir.  $\text{O}_2^{\bullet-}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin SOD tarafından dismutasyon mekanizması, Şekil 2.7'de gösterildiği gibi enzimin aktif bölgesinde Bakır (Cu) ve Mangan (Mn) gibi bir redoks aktif geçiş metalinin alternatif redüksiyonunu ve yeniden oksidasyonunu içerir. Bu, SOD aktivitesinin bir katalitik metal gerektirdiğini gösterir (55).



Şekil 2.7: SOD'lar tarafından ortak temizleme mekanizması (55)

Önemli olarak, anti-enflamatuar ve antikoagülan özelliklere ve ayrıca vazodilatör etkiye sahip nitrik oksit,  $\text{O}_2$  ile reaksiyona girerek hızla inaktive edilebilir ve güçlü oksidan peroksinitritin üretimine yol açabilir. Bu reaksiyon, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, diyabet ve yaşlanma da dahil olmak üzere endotelial ve mitokondriyal disfonksiyona yol açan,  $\text{O}_2$ 'nin vasküler üretiminin arttığı yaygın koşullarda önemlidir (55).

## 2.9. Paraoksanaz ve Arilesteraz

Paraoksanaz (PON), çok çeşitli substratlara ve lipit oksidasyonuna karşı koruma kapasitesine sahip bir hidrolitik enzimdir. Karaciğer tarafından üretilen bir enzim olan PON, yüksek yoğunluklu lipoprotein parçacıkları ile ilişkilidir ve bir antioksidan fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir. İnsanlarda, PON üç üyeye (PON1, PON2 ve PON3) sahiptir. PON1, PON, Arilesteraz (ARE) ve dyazoksonaz dahil olmak üzere bilinen üç enzimatik moleküle sahiptir. PON1 proteini, moleküler kütlesi 43 kDa olan 354 amino asitten oluşur. Ailenin her üç insan üyesi de nükleotit seviyesinde %70, amino asit seviyesinde %60 aynıdır. PON1, paraokson gibi organofosfatları hidrolize eder, fenilasetat gibi aromatik esterleri hidrolize eder ve ayrıca lipit peroksidasyon ürünlerinin birikmesini azaltır (56,57).

İnsan serum PON ve ARE, lipofilik antioksidan özelliklere sahip esteraz enzimleridir. Serum PON1, yüksek yoğunluklu lipoproteine (HDL) bağlanır ve paraokson gibi organofosfor bileşiklerinin ve lipit peroksidasyonundan kanserojen lipitte çözünür radikallerin ortadan kaldırılmasına katkıda bulunur. PON1, insan vücudundaki endojen serbest radikal süpürme sistemlerinden biridir. ARE ile birlikte serum PON1'in tek bir enzim olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. PON1 aktivitesi, kısmen polimorfizmlerle ilişkili olan bireyler arasında büyük ölçüde değişir. PON1 geninin iki ortak kodlama bölgesi polimorfizmi vardır. PON1 aktivitesinin genetik bir polimorfizmi, insan popülasyonlarında yüksek ve düşük paraokson hidrolizini belirler. PON1 ayrıca aktivite polimorfizmi sergilemeyen ve dolayısıyla enzim proteininin bir tahmini olarak hizmet edebilen ARE aktivitesine sahiptir (58).

PON1 aktivitesini değiştiren çevresel faktörler arasında, PON1 aktivitesini ve konsantrasyonunu düşürdüğü bildirilen tütün tüketimi bulunmaktadır. Ayrıca, birkaç çalışma, PON1 seviyesinin serumdaki HDL ile sıkı bir şekilde bağlantılı olduğunu ve HDL tarafından LDL oksidasyonuna karşı korumaya katkıda bulunduğunu göstermiştir. Apo A-I üzerinde taşınan HDL ile ilişkili bir enzim olan insan PON'un lipoproteinleri oksidatif modifikasyona karşı koruduğuna inanılmaktadır (59).

PON1 ayrıca plazma membranını serbest radikal yaralanmalarından korur. Ayrıca PON1, trombosit aktive edici faktör gibi biyoaktif fosfolipidleri degrade ederek damar içi pıhtılaşmayı önler. Son çalışmalar PON1'in laktonaz aktivitesine sahip olduğunu ve statin, spironolakton ve glukokortikoid laktonların metabolizmasında rol oynadığını

göstermiştir. PON2 ürünü henüz biyolojik dokuda tanımlanmamıştır, ancak PON3 gen ürünü son zamanlarda tavşan HDL'sinde bulunan bir laktonaz olarak tanımlanmıştır (60).



### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal ve Yöntem**

Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalında ve Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarında, Helsinki Deklarasyonu Kararlarına ve yerel etik kurul olan Gaziantep Üniversitesi yerel Etik Kurulunun 13.11.2019 tarihli ve 2019/415 nolu onayı ile başlamıştır. Çalışma, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (GAUN BAP TF.YLT.19.61) tarafından desteklenmiştir.

Bu çalışmaya Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Çocuk Endokrinoloji Kliniğine başvuran yaşları 1-18 arasında olan KAH tanılı 85 gönüllü hasta alındı. Kontrol grubuna, aynı yaş grubundan 43 gönüllü sağlıklı çocuk dahil edildi.

Kan alma işlemi Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı çocuk kan alma ünitesinde yapıldı. Hastalardan oturur pozisyonda ön kol antekubital bölgesi %70 alkollü pamuk ile silinerek yapılan sterilizasyondan sonra 5 ml kan alındı.

Çalışma için antikoagülsüz tüpe alınan kan örnekleri oda sıcaklığında 20 dakika bekletildikten sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip serum kısmı ayrıldı. Ayrılan serum etiketlenmiş ependorf tüplere üç ayrı porsiyona bölünerek çalışma gününe kadar -80 °C' de saklandı.

Hasta grubunda serum 17-hidroksiprogesteron, 11-deoksikortizol, ACTH, Testosteron düzeyleri ölçüldü. Hasta ve kontrol gurubunda Prolidaz, MDA, SOD, PON ve ARE düzeyleri Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında ölçüldü.

## 3.2. Parametrelerin Ölçülmesi

### 3.2.1. Rutin Analizler

17-hidroksiprogesteron, 11-deoksikortizol, Testosteron ve ACTH ölçümü antikoagülanlı tüplerde Beckman Coulter DXI 800 cihazında yapılmıştır.

### 3.2.2. Prolidaz, MDA ve SOD Ölçümünde Kullanılan Aletler

Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	Glacier
pH metre	Merck
Otomatik pipet (20-200 µL)	Thermo Scientific
Otomatik pipet (100-1000 µL)	Gilson
Vorteks	IKA-VF-2
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Stuart US152D
Hassas terazi	Sartorius TE214 S
Santrifüj	Nüve NF-800R
Su banyosu	Nüve BM 402
Ultraviolet-Visible spektrofotometre	Shimadzu UV-1601

### 3.2.3. Prolidaz

#### 3.2.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Madde Adı	Formülü	Firma ve Katalog No
Prolin	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Sigma P-0380
Glisil-Prolin	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Sigma G-3002
Glasiyel asetik asit	CH <sub>3</sub> COO	Merck 541
Ortofosforik asit	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Merck 564

Mangan klorür (II) hidrat	MnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	Merck 5917
Trizma HCL	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> HCl	Sigma T-3253
Triklorasetik asit (TCA)	C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Fluka 91232
Ninhidrin	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	

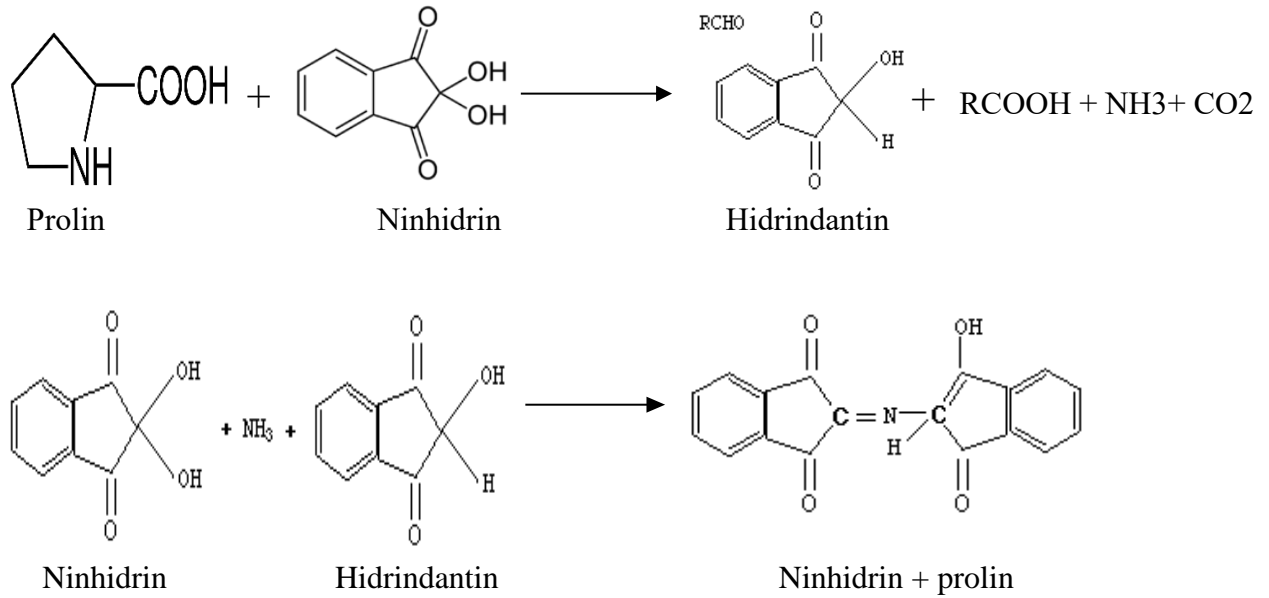
### 3.2.3.2. Prolidaz Aktivitesinin Ölçümü

Prolidaz aktivitesi ölçümünde modifiye Chinard yöntemi kullanıldı.

Chinard Yöntemi: Substrat olarak glisil-prolin kullanılarak enzim aracılığı ile oluşan prolinin asidik ortamda ısı etkisiyle ninhidrin ile renkli bir bileşik (pembe) oluşturma ilkesine dayanarak serum prolidaz düzeyi ölçülür. Rengin şiddeti prolin konsantrasyonuna bağlıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülür (61).



Şekil 3.1: Prolin Oluşumu



Şekil 3.2: Ninhidrin+ Prolin Oluşumu

### 3.2.3.3. Ayıraçlar

1. Mangan (II) Klorür ( $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ :5mmol/l): 0,2 g Mangan (II) klorür distile suda çözülüp son hacim 250 ml'ye tamamlandı, uzun süre  $+4^{\circ}C$ ' de saklandı.
2. Tampon: Trizma HCl [Tris (hidroksimetil)–aminometan hidroklorür]: (100 mmol/l pH:8): 7,88 g Trizma distile suda çözüldü ve HCl ve NaOH ile pH ayarı yapıldı. İşlem sonunda çözeltinin son hacmi 500 ml'ye tamamlandı.
3. Substrat Çözeltisi (Glisil-Prolin:100 mmol/l): 0,172 g Glisil-Prolin karışımının pH'sını 8'e sabitlemek için karışım distile suda çözüldü ve son hacim 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti günlük olarak hazırlandı.
4. Triklorasetik Asit (%20' lik): 20 g Triklorasetik asit distile suda çözüldü ve çözeltinin son hacmi 100 ml'ye tamamlandı,  $+4^{\circ}C$ 'da saklandı.
5. Ninhidrin Çözeltisi: % 85'lik orto fosforik asitten 16,28 ml alınıp, distile su ile 40 ml'ye tamamlanıp 6 M orto fosforik asit çözeltisi hazırlandı. 60 ml glasiyel asetik asit, 40 ml 6 M'lık orto fosforik asit solüsyonu ile karıştırıldı. 2,5 g ninhidrin çözelti içinde manyetik karıştırıcı ve ısı yardımıyla çözüldü. Bu çözelti  $4^{\circ}C$ ' de saklandı.
6. Prolin standardı (1 mmol/l): 0,012g L-Prolin distile suda çözünüp son hacim 100 ml olacak şekilde seyreltildi. Hazırlanan stok çözelti porsiyonlara bölünüp  $-20^{\circ}C$ ' ye alındı ve deneylerde kullanılmak için saklandı. Çalışma solüsyonu olan 0,15 mmol/l, günlük standart olarak bu stoktan hazırlandı.

### 3.2.3.4. İşlem

Serum prolidaz aktivitesini ölçmede kullanılan yöntem literatürde mevcut olan insan eritrosit ve serum prolidaz aktivitesini ölçmede kullanılan yöntemlerin modifikasyonudur (62). Eritrosit prolidazı aktivite ölçümü sırasında uygulanan basamaklar ayrıntılı bir şekilde anlatıldı. Çalışma için ayrılan hasta ve kontrol gruplarına ait serum örnekleri derin dondurucudan alınıp oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Bütün ölçümler çift tekrar çalışıldı.

1. İlk olarak 50 µl serum, 9.95 ml 2.5 mmol/l MnCl<sub>2</sub> karıştırıcı ile karıştırılıp 2 saat 37 °C su banyosunda preinkübe edildi.

**Not:** İnsan serumundaki prolidaz aktivitesi eritrosit prolidaz aktivitesinden düşük olduğundan (yaklaşık %6'sı) bu oran değiştirildi. Yapılan birçok deney sonucu serum 1/40 oranında (tampon+Mn<sup>+2</sup>) sulandırıldı. Daha önce yapılan serum prolidaz deneylerindeki 24 saat olan preinkübasyon zamanı ise 2 saate düşürüldü.

2. İkinci basamakta her örnek için 2 ayrı tüp alındı.

<b>Ayrıçlar</b>	<b>1.tüp (0 zaman)</b>	<b>2.tüp (30.dk)</b>
100 mM substrat (µl)	400	400
100 mM tampon (µl)	400	400
Distile su (µl)	100	100
Preinkübe edilmiş örnek (µl)	100	100

İnkübasyon tüplerinin ağzı parafilmle kapatılıp, vorteks ile karıştırıldı ve 30 dakika 37°C'da su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere 500 µl TCA ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Sıfır zaman tüplerine ise aynı hacimde preinkübe edilmiş örnek eklenir eklenmez 500 µl TCA ilave edilip reaksiyon durduruldu. Daha sonra sıfır zaman ve inkübasyon tüpleri 5 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi. Oluşan süpernatandan 1ml alınarak spektrofotometrik prolidaz aktivitesi ölçümü için kullanıldı.

3. Prolidaz aktivitesinin spektrofotometrik ölçümü için; Her örnek için ağzı kapaklı 4 tüp alındı ve her tüp aşağıdaki şekilde hazırlandı.

<b>Ayrıçlar</b>	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>0 zaman</b>	<b>İnkübasyon (30.dk)</b>
Glasiyel asetik asit (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5
Süpernatant (ml)	-	-	1	1
Standart (ml)	-	1	-	-
Distile su (ml)	1	-	-	-
Ninhidrin (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5

Bu dört tüp hazırlandıktan sonra ağzı sıkıca kapatılarak vortekslenip 20 dakika 95°C kaynar su banyosunda tutuldu. Kaynar su banyosunun sonunda tüpler reaksiyonu durdurmak için buzlu su banyosunda 10 dakika soğutulurken absorbanları spektrofotometrede köre karşı 515 nm’de ölçüldü.

### 3.2.3.5. Prolidaz Aktivitesini Hesaplanması

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

B: İnkübasyon tüpü (30 dakika) absorban değeri

A: Sıfır zaman tüpü absorban değeri

[S] : Standart konsantrasyonu (mmol/L)

S : Standart absorban değeri

Faktör :  $\frac{\text{Preinkübasyon ortamındaki sulandırma} \times \text{İnkübasyon ortamındaki sulandırma}}{\text{İnkübasyon zamanı}}$

F:  $\frac{40 \times 15}{30}$

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

(1 litrede 1 dakikada oluşan mmol prolidaz aktivitesi)

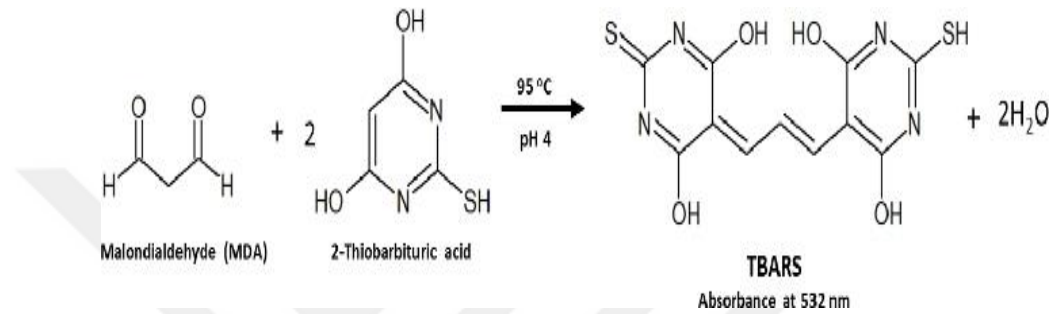
Prolidaz aktivite düzeyi:  $\frac{(A-B) \times [S] \times \text{Faktör} \times 60}{S}$

(1 litrede 1 saatte oluşan mmol prolidaz aktivitesi)

Serumda aktivite tanımı: 1 milimol substratı, 37 °C ve 1 saate değişikliğe uğratan enzim miktarı olarak yapıldı. Birim Ü/L olarak tanımlandı.

### 3.2.4. Malondialdehit (MDA)

MDA düzeylerini belirlemek için, Jain ve ark. tarafından tanımlanan tiyobarbitürik asit (TBA) metodu esas alınarak yapılmıştır (63). MDA içeriği ölçülmesinde MDA'nın TBA ile reaksiyona girmesi esas alınır. MDA, TBA ile bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin oluşturduğu pembe renkli bileşiğin 532 nm dalga boyunda verdiği absorbansın ölçülmesi esasına dayanır.



Şekil 3.3: MDA- TBA kompleksinin oluşumu (64)

#### 3.2.4.1. Ayırıcılar

1. Fosfat tamponu ile tamponlanmış serum fizyolojik çözeltisi: 8.1 gr NaCl, 2.302 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.194 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartıldı ve bir miktar distile suda eritildi. Son hacim 1 L'ye tamamlandı ve pH 7.4'e ayarlandı.
2. %30'luk TCA çözeltisi: 30 gr TCA bir miktar distile suda çözüldü ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.
3. % 0.8'lik BHT çözeltisi: 0.088 gr BHT tartılarak 10 ml mutlak alkolün içinde eritildi. Çözelti hazırlandıktan sonra karanlıkta muhafaza edildi.
4. 0.1 M EDTA çözeltisi: 37.224 gr EDTA- Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O distile suda çözülerek son hacim 1 L'ye tamamlandı.
5. 0.05 N NaOH çözeltisi: 2 gr NaOH bir miktar distile suda eritilip son hacim 1 L'ye tamamlandı.
6. % 1'lik TBA çözeltisi: 1 gr TBA manyetik karıştırıcı yardımı ile 100 ml 0.05 N NaOH içinde eritildi. Çözelti hazırlandıktan sonra hava almayacak şekilde muhafaza edildi.

### 3.2.4.2. İşlem

Çalışma için ayrılan hasta ve kontrol gruplarına ait serum örnekleri -80 °C'den alınıp oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 0.2 ml numuneye 0.8 ml fosfat tamponu ile tamponlanmış serum fizyolojik çözeltisi, 0.025 ml % 0.88'lik BHT çözeltisi ve 0.5 ml %30'luk TCA çözeltisi eklendi. Tüpler karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra 2 saat buzda bekletildi. Daha sonra 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatan kısmından 1 ml alınıp başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 0.025 ml % 1'lik TBA ve 0.075 ml 0.1 M'lik EDTA eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 95°C'lik kaynar su banyosunda 20 dakika bekletildi. Kaynar suda bekletme aşamasından sonra tüpler oda sıcaklığına gelinceye kadar beklendi ve absorbansları köre karşı 532 nm'de spektrofotometrede okundu.

### 3.2.4.3. MDA Düzeylerinin Hesaplanması

Hesaplamalar MDA-TBA kompleksinin 532 nm'de absorbans değerlerinin molar ekstinksiyon katsayısıyla ( $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) çarpılmasıyla elde edildi. Değerler nmol/L cinsinden ifade edildi.

### 3.2.5. Superoksit Dismutaz

SOD aktivitesi, Sun ve ark. tarafından önerilen yöntem kullanılarak yapıldı (65). Reaktif içerisinde bulunan ksantin, ksantin oksidaz (XO) enzimi tarafından ürik aside oksitlenirken ortaya çıkan  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikali numunede mevcut SOD için substrat görevi görür. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz (XO) kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, Nitro Blue Tetrazolium (NBT) ile meydana getirdiği mavi renkli formazan boyasının 560 nm dalga boyunda verdiği absorbans değerinin okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak formazan reaksiyonunu inhibe eder.

### 3.2.5.1. Ayıraçlar

1. 0.3 mmol/L Ksantin: 9.13 mg ksantin bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 200 ml'ye tamamlandı.

2. 0.6 mmol/L Etilendiamin tetraasetik asit-2 Na tuzu (EDTA): 25 mg EDTA bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3. 150 µmol/L Nitrobluetetrazolyum (NBT): 12.3 mg NBT bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

4. 400 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 2.54 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 60 ml'ye tamamlandı.

5. 1 gr/L Bovin Serum Albumin (BSA): 30 mg BSA üzerine yaklaşık 15 ml distile su ilave edildi. Köpürtmeden alt üst edilerek karıştırıldı. Son hacim distile su ile 30 ml'ye tamamlandı. Işık geçirmeyen şişede +4°C' de saklandı.

İlk beş çözeltilerin yukarıda belirlenen miktarları karıştırılarak ölçüm reaktifi hazırlandı. Koyu renkli şişede +4°C' de saklandı.

6. 2 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2.64 gr (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> alınıp 10 ml distile suda çözüldü.

7. 167 U/L Ksantin Oksidaz (XO): 10 µL XO alınıp üzerine, 2 mol/L'lık (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltilisinden 1 ml eklendi. Tüp birkaç kez alt üst edilerek karıştırıldı. Enzim çözeltilisi çalışma esnasında hazırlandı.

### 3.2.5.2. İşlem

	<u>KÖR</u>	<u>NUMUNE</u>
Deney reaktifi	2.45 ml	2.45 ml
Supernatan	-	0.5 ml
Distile su	0.5 ml	-
Ksantin Oksidaz (167 U/l)	0.05 ml	0.05 ml

Tüpler 25°C'de 20 dakika inkübe edildi.

Reaksiyon sonucu oluşan ürün formazanının absorbanansı 560 nm de okundu.

### 3.2.5.3. SOD Aktivitesinin Hesaplanması

$$\% \text{ inhibisyon} = [(A_{\text{kör}} - A_{\text{numune}}) / A_{\text{kör}}] \times 100$$

$A_{\text{kör}}$ : Körün absorbanansı

$A_{\text{numune}}$ : Numunenin absorbanansı

$$\text{Aktivite (U/ml)} = [ (\% \text{ inhibisyon} / 50 \times 0,5) \times \text{Dilüsyon Faktörü} ]$$

1 Ünite SOD: NBT redüksiyonunu %50 inhibe eden enzim aktivitesidir.

### 3.2.6. Paraoksanaz

Serum örneklerinin PON aktivitesi Rel Assay tarafından geliştirilen tam otomatik yöntem kullanılarak incelendi. Bu metoda göre PON aktivitesi ortamda NaCl (bazal paraoksanaz aktivitesi) ve NaCl (tuz ile uyarılmış paraoksanaz aktivitesi) olmadan ölçülür. PON'un hidrolizi ile absorbanans artışının takibi 37 °C ve 412 nm de incelendi. Miktarı ortaya çıkan p-nitrofenol hidrolizi molar soğurma katsayısı 17,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> kullanılarak hesaplanır (pH 8'de). Enzimatik aktiviteye sahip net değer tuz ile uyarılan aktivite değerinden bazal aktivite değeri çıkartılarak hesaplandı. Sonuçlar 1 litrede ve 1 daikada 1 mikromol substratın hidrolizine denk olan litre başına ünite olarak ifade edildi.

### 3.2.7. Arilesteraz

Serum örneklerinin ARE aktivitesi Rel Assay Diagnostics tarafından geliştirilen tam otomatik yöntem kullanılarak ölçülmüştür. Bu metoda göre ARE aktivitesinin ölçümü için fenilasetat substrat olarak kullanılır ve fenilasetatın hidroliziyle fenol ve astetik asit

oluşur. Ortaya çıkan fenol, 4-aminoantipirin ve potasyum ferrisiyanite katılır ve kolorimetrik yöntemle ölçülür. ARE aktivitesi ortaya çıkan renkli kompleksin molar soğurma katsayısı olan  $4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  'den hesaplandı. Sonuçlar 1 litrede ve 1 dakikada 1 mikromol substratın hidrolizine denk olan litre başına ünite olarak ifade edildi.

### **3.2.8. İstatistiksel Yöntem**

Sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shaphiro Wilk testi ile test edilmiştir. Normal dağılan değişkenlerin iki grupta karşılaştırılmasında Student t testi, normal dağılmayan değişkenlerin iki grupta karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Normal dağılmayan değişkenlerin üç ve daha fazla grupta karşılaştırılmasında Kruskall Wallis ve Dunn çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır. Sayısal değişkenler arasındaki ilişki Spearman rank korelasyon katsayısı ile test edilmiştir. Analizlerde SPSS 22.0 Windows versiyon paket programı kullanılmıştır.  $P < 0,05$  anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmaya KAH tanısı konulmuş 85 gönüllü hasta, yaş ve cinsiyet uyumlu 43 gönüllü sağlıklı dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm gönüllü çocukların ortalama yaşı  $7,55\pm 4,66$ . Hasta grubunda ortalama yaş  $7,81\pm 4,57$  iken kontrol grubunda  $7,29\pm 4,75$  'dir. İstatiksel olarak incelendiğinde yaş bakımından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p=0,599$ ). Çalışmaya dahil edilen 85 hastadan 48'i kız ve 37'si erkek, kontrol grubu ise 24 kız ve 19 erkek gönüllüdür. İstatiksel olarak incelendiğinde cinsiyet bakımından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p=0,333$ ). Ayrıca çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grupları arasında kilo, boy ve Vücut Kitle İndeksi Standart Sapma (VKİ-SDS) açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1:** Çalışma grubunun demografik verileri

	Hasta n= 85	Kontrol n=43	Toplam n=128	P
Cinsiyet (K/E)	48/37	24/19	72/56	0,333
Yaş (Ort.± SS)	$7,81\pm 4,57$	$7,29\pm 4,75$	$7,55\pm 4,66$	0,599
Kilo	$34,13\pm 20,75$	$33,47\pm 20,75$	$33,8\pm 20,75$	0,828
Boy	$122,06\pm 28,73$	$120,49\pm 32,65$	$121,27\pm 30,69$	0,946
VKİ-SDS	$1,13\pm 1,56$	$1,02\pm 1,65$	$1,07\pm 1,60$	0,872

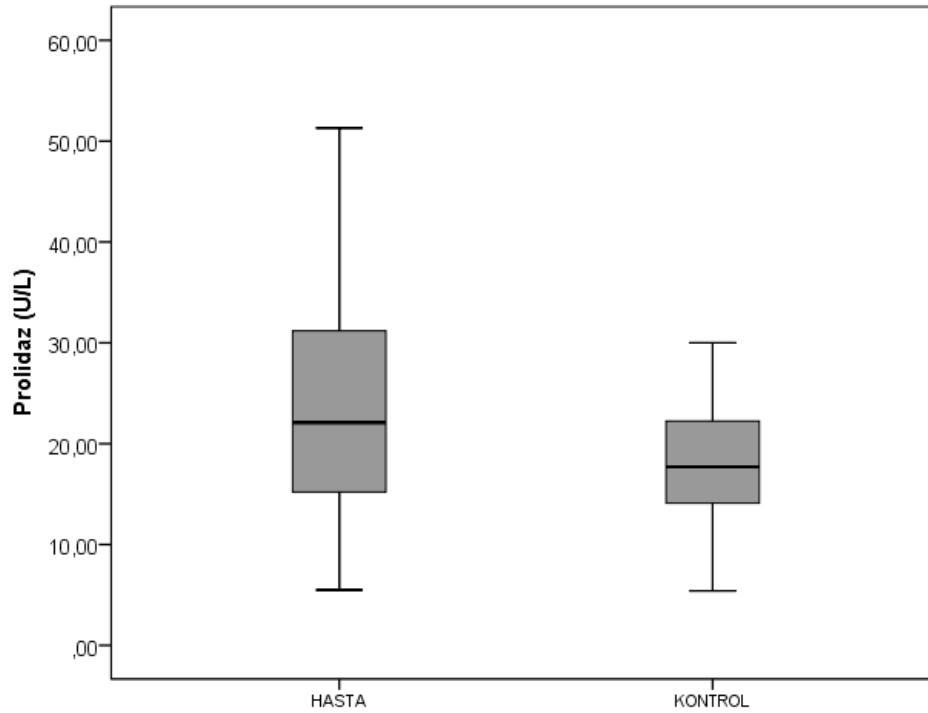
Çalışmada yer alan hasta ve kontrol gruplarının Prolidaz, MDA, SOD, PON ve ARE düzeyleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Hasta grubunun Prolidaz, MDA ve SOD ölçümleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

**Tablo 4.2:** Çalışılan parametre sonuçlarının hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılması

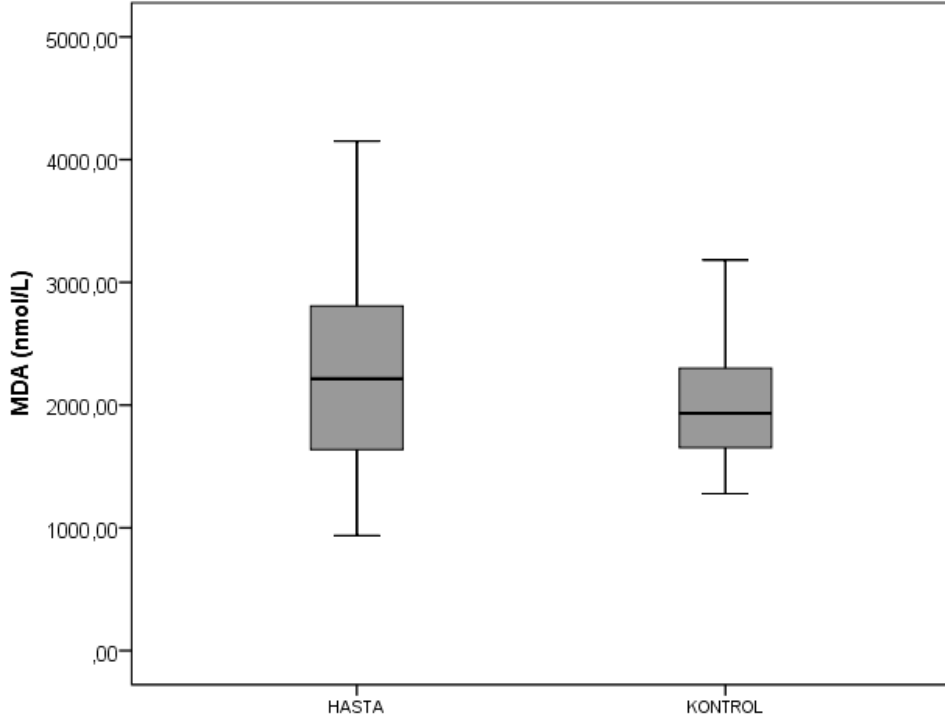
	<b>HASTA</b> <b>n=85</b>		<b>KONTROL</b> <b>n=43</b>		<b>P</b>
	Ortalama	St.Sapma	Ortalama	St.Sapma	
<b>Prolidaz (U/L)</b>	24,16	11,13	18,60	6,58	0,010*
<b>MDA (nmol/L)</b>	2271,87	731,28	1996,51	462,23	0,026*
<b>SOD (U/ml)</b>	10,45	4,82	12,49	3,68	0,016*
<b>PON (U/L)</b>	270,39	170,19	239,07	167,45	0,266
<b>ARE (kU/L)</b>	454,26	213,84	415,43	219,90	0,269

P<0,05 anlamlı

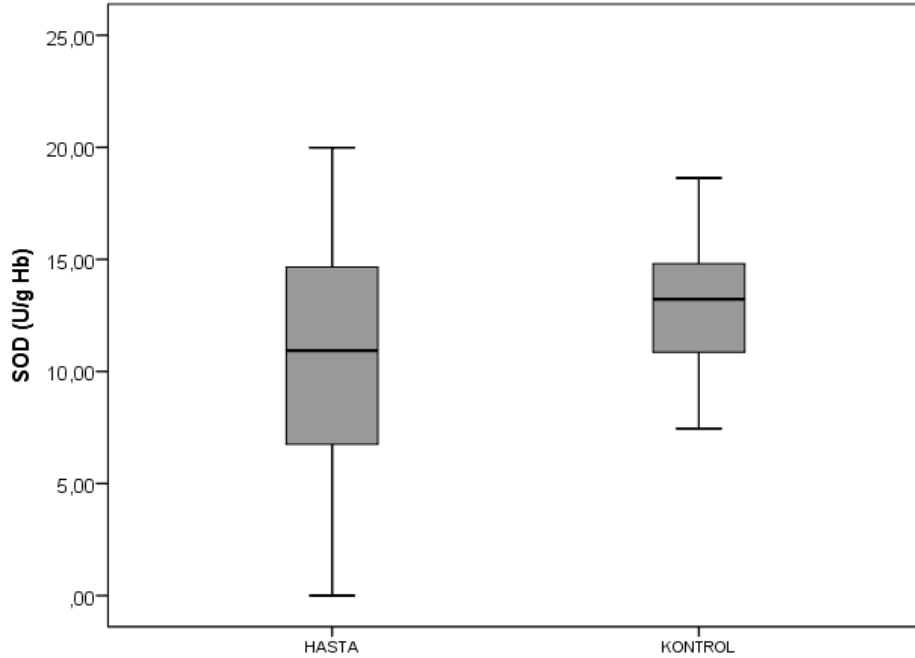
Hasta ve kontrol gruplarında Prolidaz, MDA, SOD, PON ve ARE düzeylerinin ortalama ve standart sapma uyumlu grafikleri aşağıda gösterilmiştir.



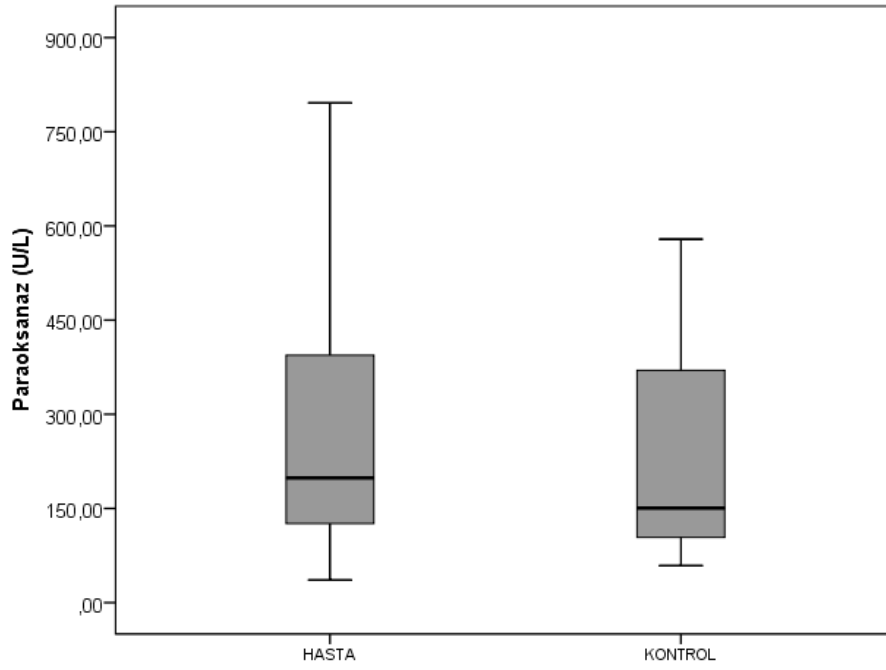
**Şekil 4.1:** Prolidaz düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı (Dikdörtgeni oluşturan orta, alt ve üst yatay çizgiler sırası ile ortanca, 25. ve 75. persentilleri, dikey çizgiler interkuartil aralığı göstermektedir)



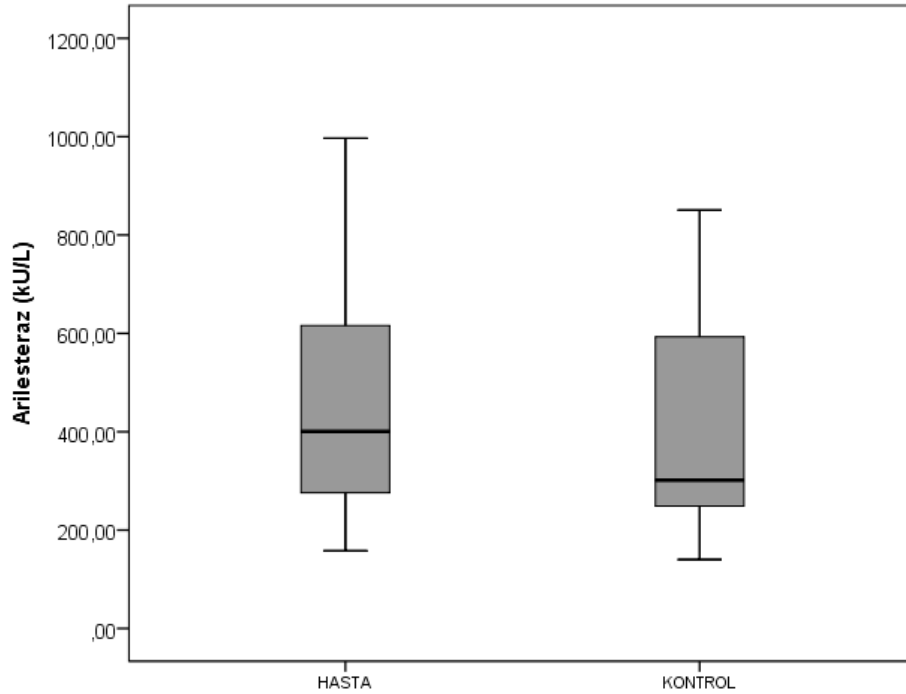
**Şekil 4.2:** MDA düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı (Dikdörtgeni oluşturan orta, alt ve üst yatay çizgiler sırası ile ortanca, 25. ve 75. persentilleri, dikey çizgiler interkuartil aralığı göstermektedir)



**Şekil 4.3:** SOD düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı (Dikdörtgeni oluşturan orta, alt ve üst yatay çizgiler sırası ile ortanca, 25. ve 75. persentilleri, dikey çizgiler interkuartil aralığı göstermektedir)



**Şekil 4.4:** PON düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı (Dikdörtgeni oluşturan orta, alt ve üst yatay çizgiler sırası ile ortanca, 25. ve 75. persentilleri, dikey çizgiler interkuartil aralığı göstermektedir)



**Şekil 4.5:** ARE düzeyinin gruplar arasındaki dağılımı (Dikdörtgeni oluşturan orta, alt ve üst yatay çizgiler sırası ile ortanca, 25. ve 75. persentilleri, dikey çizgiler interkuartil aralığı göstermektedir)

Çalışılan parametre sonuçları hasta grubunda KAH tipleri (11 BETA, BV, TKT) arasında incelenmiştir ve anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3:** Çalışılan parametre sonuçlarının KAH tipleri arasında karşılaştırılması

	11 BETA	BV	TKT	P
	Ort.±St. Sapma	Ort.±St. Sapma	Ort.±St. Sapma	
Prolidaz (U/L)	24,6±49,26	24,14±7,87	24,10±12,08	0,819
MDA (nmol/L)	2329,22±884,25	2350,93±525,81	2245,69±756,52	0,960
SOD (U/ml)	10,68±3,30	11,69±4,66	10,14±5,05	0,549
PON (U/L)	274,00±168,06	266,92±183,51	270,64±170,84	0,818
ARE (kU/L)	433,88±191,24	464,08±196,53	455,16±224,51	0,965

P<0,05 anlamlı

**Tablo 4.4:** Hasta grubunda biyokimyasal parametrelerin KAH tipleri arasında karşılaştırılması

	11 BETA	BV	TKT	P
	Ort.±St. Sapma	Ort.±St. Sapma	Ort.±St. Sapma	
17 OH progesteron düzeyi (tanı)	3,10±3,13	16,48±36,84	51,48±298,07	0,014*
17 OH progesteron düzeyi (yüksek)	7,59±6,97	56,89±57,69	147,45±418,04	0,001*
11 deoksikortizol düzeyi (tanı)	37,61±52,01	1,03±2,39	7,62±19,23	0,001*
11 deoksikortizol düzeyi (yüksek)	99,70±86,61	23,23±76,17	12,55±29,32	0,001*
ACTH (tanı)	150,39±168,66	80,32±121,83	215,16±352,47	0,345
ACTH (yüksek)	377,96±415,53	2054,42±6507,20	510,89±430,72	0,313
Testesteron (tanı)	5559,35±16642,00	33,87±64,77	88,87±213,21	0,451
Testesteron (yüksek)	106,03±156,39	58,61±63,21	141,53±237,79	0,689
Hidrokortizon m <sup>2</sup> /gün	18,63±12,41	17,55±10,84	26,99±32,33	0,177

P<0,05 anlamlı

Hasta grubunda 17 OH progesteron, 11 Deoksikortizol, ACTH, Testosteron verilerinin tanıdaki ve ölçülen en yüksek değerleri KAH tipleri arasında incelenmiştir. Hasta grubunda 17 OH progesteron ve 11 deoksikortizol düzeyleri KAH tipleri arasında anlamlı derecede fark bulunmuştur (Tablo 4.4).

Çalışmaya dahil olan hasta grubunda Prolidaz, MDA, SOD, PON, ARE, 17 OH progesteron, 11 deoksikortizol, ACTH, Testosteronun birbirleriyle ilişkisi incelenmiştir. SOD ile ACTH arasında negatif yönde zayıf bir ilişki bulunmuştur ( $r = -0,301$ ;  $p = 0,005$ ). SOD ile testosteron arasında negatif yönde zayıf bir ilişki bulunmuştur ( $r = -0,232$ ;  $p = 0,036$ ). PON ile ARE arasında pozitif yönde çok zayıf bir ilişki bulunmuştur ( $r = 0,920$ ;  $p = 0,000$ ). 17 OH progesteron ile ACTH arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki bulunmuştur ( $r = 0,275$ ;  $p = 0,011$ ) (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5:** Hasta grubu korelasyon analizi

	Prolidaz	MDA	SOD	PON	ARE	17 OH progesteron	11 deoksi kortizol	ACTH	Testosteron
Prolidaz	1,000	,095	,080	,100	,120	-,064	,036	,102	-,100
MDA	,095	1,000	,052	,025	-,010	-,091	,018	-,025	-,159
SOD	,080	,052	1,000	,080	,045	-,017	-,007	<b>-,301**</b>	<b>-,232*</b>
PON	,100	,025	,080	1,000	<b>,920**</b>	-,043	-,099	-,136	-,036
ARE	,120	-,010	,045	<b>,920**</b>	1,000	,004	-,119	-,171	-,090
17 OH progesteron	-,064	-,091	-,017	-,043	,004	1,000	-,133	<b>,275*</b>	,216
11 deoksi kortizol	,036	,018	-,007	-,099	-,119	-,133	1,000	-,095	-,067
ACTH	,102	-,025	<b>-,301**</b>	-,136	-,171	<b>,275*</b>	-,095	1,000	,177
Testosteron	-,100	-,159	<b>-,232*</b>	-,036	-,090	,216	-,067	,177	1,000

\*: $p < 0,05$  anlamlı \*\*: $p < 0,001$  çok anlamlı

Çalışmaya dahil olan kontrol grubunda VKİ SDS, Prolidaz, MDA, SOD, PON, ARE'nin birbirleriyle ilişkisi incelenmiştir. PON ile ARE arasında pozitif yönde çok zayıf bir ilişki bulunmuştur ( $r=0,836$ ;  $p=0,000$ ) (Tablo 4.6).

**Tablo 4.6:** Kontrol grubu korelasyon analizi

	VKİ SDS	Prolidaz (U/L)	MDA (nmol/L)	SOD (U/ml)	PON (U/L)	ARE (kU/L)
VKİ SDS	1,000	-,207	-,292	,189	-,165	-,084
Prolidaz (U/L)	-,207	1,000	,140	,046	,213	-,012
MDA (nmol/L)	-,292	,140	1,000	-,202	,098	,055
SOD (U/ml)	,189	,046	-,202	1,000	,016	-,068
PON (U/L)	-,165	,213	,098	,016	1,000	<b>,836**</b>
ARE (kU/L)	-,084	-,012	,055	-,068	<b>,836**</b>	1,000

\*:p<0,05 anlamlı \*\*:p<0,001 çok anlamlı

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

21-hidroksilaz eksikliğine bağlı KAH, CYP21A2 genindeki mutasyonların neden olduğu adrenal korteksin otozomal resesif bir hastalığıdır (66). Gelişen teknolojiler, KAH'ın doğum öncesi ve hatta gebelik öncesi teşhisi için fırsat sunmaktadır. Erken teşhis, doğum öncesi androjen maruziyetinin potansiyel sonuçlarının artan farkındalığıyla ebeveynlere danışmanlık için yardımcı olabilse de ciddi şekilde virilize olmuş dişiler için halen devam etmektedir. Benzer şekilde, bu popülasyon için cinsellik ve yaşam kalitesi ölçütlerine ilişkin daha ileri çalışmalara izin verilmektedir. En önemlisi, değiştirilmiş salımlı hidrokortizon preparatı gibi yeni terapötik modaliteler, KAH'lı hastalar için daha iyi yaşam kalitesi sağlayabilir (67).

CYP21A2, progesterondan aldosteron ve 17-hidroksiprogesterondan kortizol biyosentezi için gerekli olan, ağırlıklı olarak adrenal kortekste eksprese edilen mikrozomal bir CYP450'dir (4). Yaşam boyunca CYP450 enzimlerinin yüksek düzeyde korunmasından dolayı, önemli içsel işlevler oynamaları muhtemeldir. CYP450 araştırması için bir başka heyecan verici yol da CYP450'lerin dahil olduğu diğer reaksiyon türlerini anlamamızdır (68). Çeşitli CYP450 enzimlerinin ayrıntılı katalitik etki mekanizmalarının ROT oluşumu / bozulmasıyla ilişkili olarak ortaya çıkarılması, ROT ve oksidatif stresin oynadığı sayısız insan hastalığı ile ilişkili olarak ROT metabolizmasındaki CYP450 enzimlerinin rolünün daha iyi anlaşılmasına yol açmalıdır (5).

Prolin içeren imidodipeptidlerin hidrolizinden sorumlu bir metaloenzim olan prolidaz, protein metabolizmasında ki prolinin serbest bırakılmasında önemlidir. İnsanlarda prolidaz, kollajen içeren bağ dokusunun korunması, yeniden inşası ve bozulması için gereklidir. Prolidaz aktivitesinin düzensizliği, kollajen metabolizmasında bozulmalar olarak kendini gösterir. Prolidaz aktivitesindeki anormallikler, kanserler ve fibrotik süreçler gibi birçok hastalık durumunda mevcuttur. Prolidaz aktivitesi, bu koşulların erken tespiti ve izlenmesinde faydalı bir işaret olabilir. (7).

Yaptığımız çalışmada prolidaz enzim aktivitesi sağlıklı kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Çalışmamızdaki hastalarda gözlenen yüksek prolidaz seviyesi önemli bir biyokimyasal parametredir. Prolidaz

enzim aktivitesi kollajen metabolizmasındaki değişikliklerle birlikte kollajen döngüsünün bozulması ve bunun sonucunda metabolik hızdaki artışı gösterir. KAH'da prolidaz düzeyinin artması patolojik bir durumla ilişkilendirilebilir.

Prolidaz aktivitesiyle ilgili birçok klinik çalışma bulunmaktadır ve çok kapsamlı çalışmalar da yapılmaya devam etmektedir. Bozkurt ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada serum prolidaz enzim aktivitesini ve oksidatif stres sağlıklı kontrollere kıyasla Fibromiyaljili hastalarda anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır. Bu veriler, serum prolidaz enzim aktivitesi ile Fibromiyalji arasında daha önce bildirilmemiş bir ilişki olduğunu göstermektedir (69).

Aktürk ve arkadaşları koroner arter ektazili hastalarda normal koroner arterleri olanlara kıyasla prolidaz aktivitesi düzeylerinin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Prolidaz aktivitesini koroner arter ektazi ile önemli ölçüde ilişkilendirmişlerdir (70).

Lipid peroksidasyon, biyolojik sistemlerde enzimatik kontrol altında lipitten türetilmiş enflamatuvar araçların oluşturulması için veya enzimatik olmayan şekilde meydana gelebilen, serbest radikalle ilişkili bir süreçtir. Bu süreçte hücrel antioksidanları da içeren oksidatif stresin bir sonucu olarak hücrel hasarla ilişkilendirilmiştir (48). Lipid peroksidasyon yan ürününün birikimi birçok çalışmada kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve birçok toksik doku yaralanmasında ve patolojik süreçlerde rol oynamıştır (49).

MDA lipid peroksidasyonun son ürünüdür. Ayrıca bir oksidatif hasar indikatörü ve oksidatif stresin bir göstergesidir. Yaptığımız çalışmada KAH'lı çocuklarda MDA düzeylerinin sağlıklı gruba göre anlamlı olarak daha yüksek bulduk ( $p<0,05$ ). Oksidatif stres, oksidanların ve antioksidanların hücrel seviyeleri arasındaki dengesizlik durumudur. Bu durum KAH'lı hastalarda dokuların hücrel hasarına sebep olma eğiliminde olabilir.

Kılıç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bağırsak solucanı ile enfekte hastalarda kontrol grubuna göre MDA düzeyleri yüksek bulunmuştur. Kılıç ve arkadaşlarına göre hastalarda yüksek MDA düzeylerinin ana nedenlerinden biri, dokuları serbest radikal hasarından koruyan savunma sisteminin aktivitesinin azalması olabileceğidir (48).

Cemek ve arkadaşları yaptıkları çalışmada akut otitis media ve tonsillitli çocuklarda serum MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu bulmuşlardır (71). Bu alanda yapılan literatür çalışmaları bizim çalışmamızı desteklemektedir.

SOD'lar, oksijen varlığında yaşayan organizmaların evrensel enzimleridir. Süperoksidin oksijene ve hidrojen peroksit dönüşümünü katalize ederler. Süperoksit anyonlar, özel sinyal enzimlerinin yanı sıra mitokondriyal solunum dahil olmak üzere çeşitli metabolik işlemlerin yan ürününün amaçlanan ürünüdür. Aktiviteleri sayesinde, SOD enzimleri çeşitli ROT ve RAT seviyelerini kontrol eder, böylece hem bu moleküllerin potansiyel toksisitesini sınırlar hem de sinyal verme fonksiyonları tarafından düzenlenen hücresel yaşamın geniş yönlerini kontrol eder (72).

Yaptığımız çalışmada ölçülen SOD düzeyi hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır ( $p<0,05$ ). Bu durum KAH hastalarında oksidatif stresin arttığını, hücreleri serbest radikal hasarına karşı oluşan savunma sisteminin aktivitesindeki düşüşünü ve SOD aktivitesindeki yetersizliği gösterir.

Karatas ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada Romatoid artritli hastalarda SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre daha düşük bulunduğunu, bu hastalarda oksidatif stres arttığını ve antioksidan durumu düşük olduğunu belirtmişlerdir. Karatas ve arkadaşlarına göre bu değişiklikler muhtemelen lipid peroksidasyonunu azaltma çabalarından ve dolayısıyla doku hasarını azaltma çabalarından kaynaklanmaktadır (73).

Staron ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada Romatoid artritli hastalarda SOD aktivitesini kontrol grubuna göre daha düşük bulmuşlardır. Staron ve arkadaşlarının çalışması sonucunda SOD aktivitesinin inhibisyonu gözlenmiş, bu da Romatoid hastalarında oksidatif stresteki artışı doğrulamıştır (74). Literatür çalışmaları bizim çalışmamızı desteklemektedir.

PON ve ARE, aynı gen tarafından kodlanan ve benzer aktif merkezlere sahip enzimlerdir (75). Bizim çalışmamızda PON ve ARE düzeyleri açısından hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Shouman ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada hemodiyaliz hastalarında ARE düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük, PON düzeyinde anlamlı bir fark bulmuşlardır (76). Erdem ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada serum PON veya ARE düzeyleri açısından ankilozan spondilit hastaları ve kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını belirtmişlerdir (56). Koç ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada PON düzeyinin Tinnitus hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulmuşlardır. Koç ve arkadaşlarına göre, tinnituslu hastalar güçlü oksidatif strese maruz kalmıştır. Oksidatif stres, kulak çınlaması patogenezinde katkıda bulunan anahtar faktör olabilir (77).

Sonuç olarak Konjenital Adrenal Hiperplazinin ROT ürettiğini, hastalarda oksidatif stresin arttığını, hücrelerde serbest radikal hasarına karşı oluşan savunma sisteminin aktivitesindeki düşüşünü gördük. Tüm bunlar ROT ve oksidatif stresin oynadığı sayısız insan hastalığı ile ilişkili olarak ROT metabolizmasında antioksidan enzimlerin rolünün önemini göstermektedir. Bununla birlikte protein metabolizmasında prolinin serbest bırakılması için kritik öneme sahip olan prolidazın kollajen içeren bağ dokusunun korunması, yeniden inşası için gerekli olduğunu, prolidaz aktivitesinin düzensizliğinin kollajen metabolizmasında bozulmalar olarak kendini gösterdiğini gözlemledik. Bu çalışmanın bize KAH'da prolidaz aktivitesinin rolünün ve antioksidan moleküllerle ilişkisinin yeni yaklaşımların ortaya çıkması açısından önemli olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızın literatüre faydalı olabileceği ve daha sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

## Sonuçlar:

1. Prolidaz enzim aktivitesi sağlıklı kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).
2. KAH'lı çocuklarda MDA düzeyleri sağlıklı gruba göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. ( $p<0,05$ ).
3. Ölçülen SOD düzeyi hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır ( $p<0,05$ ).
4. PON ve ARE düzeyleri açısından hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).
5. Hasta grubunda 17 OH progesteron ve 11 deoksikortizol düzeyleri KAH tipleri arasında anlamlı derecede fark bulunmuştur.
6. SOD ile ACTH arasında negatif yönde zayıf bir ilişki bulunmuştur ( $r= -0,301$ ;  $p=0,005$ ).
7. SOD ile Testosteron arasında negatif yönde zayıf bir ilişki bulunmuştur ( $r= -0,232$ ;  $p=0,036$ ).
8. PON ile ARE arasında pozitif yönde çok zayıf bir ilişki bulunmuştur ( $r= 0,920$ ;  $p=0,000$ ).
9. 17 OH progesteron ile ACTH arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki bulunmuştur ( $r=0,275$ ;  $p=0,011$ ).

## 6. KAYNAKLAR

1. İzol AN, Kulaksızoğlu M, Başçıl N. Konjenital Adrenal Hiperplazi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2007;27(2):261-71
2. Konjenital Adrenal Hiperplazi (KAH), T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Metabolik Ve Endokrin Hastalıkları Tarama Programı. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/> Erişim tarihi: 14.03.2020.
3. Therrell BL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:15-30.
4. Pikuleva I, Waterman M. Cytochromes P450: Roles in Diseases 2013; 288(24): 17091–17098.
5. Veitha A, Moorthya B. Role Of Cytochrome P450s In The Generation And Metabolism Of Reactive Oxygen Species. 2018; 7: 44–51.
6. Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M, Savran EŞ, Yılmaz B. The Role Of Antioxidant Enzymes İn Oxidative Stress - Superoxide Dismutase (Sod), Catalase (Cat) And Glutathione Peroxidase (Gpx). *Med J SDU* 2019; 26(3): 362-369.
7. Kitchener RL, Grunden AM. Prolidase function in proline metabolism and its medical and biotechnological applications. *J Appl Microbiol.* 2012;113(2):233-47.
8. Mak P, Denisov I. Spectroscopic studies of the cytochrome P450 reaction mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2018; 1866(1): 178–204.
9. Guengerich FP. Human cytochrome P450 enzymes in Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry. 2005;377–530,
10. Guengerich FP. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 2008;21, 70–83
11. Lamb D and Waterman M. Unusual properties of the cytochrome P450 superfamily. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013; 368(1612): 20120434.
12. Nebert D, Wikvall K, Miller W. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013; 368(1612): 20120431.
13. Veith A and Moorthy B. Role Of Cytochrome P450s In The Generation And Metabolism Of Reactive Oxygen Species *Curr Opin Toxicol.* 2018; 7: 44–51.
14. Nelson DR. The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics.* 2009;4(1):59–65.
15. White RE, Coon MJ. Oxygen activation by cytochrome p-450. *Annu Rev Biochem.* 1980;49:315–356.
16. Pearce M, DeMartino L, McMahon R, Hamel R, Maloney B, Stansfield DM, McGrath EC, Occhionero A, Gearhart A, Caggana M and Tavakoli NP. Newborn

screening for congenital adrenal hyperplasia in New York State. *Mol Genet Metab Rep*. 2016; 7: 1–7.

17. Zhao B, Lei L, Kagawa N, Sundaramoorthy M, Banerjee N, Nagy LD, Guengerich FP and Waterman MR. Three-dimensional Structure of Steroid 21-Hydroxylase (Cytochrome P450 21A2) with Two Substrates Reveals Locations of Disease-associated Variants. *J Biol Chem*. 2012; 287(13): 10613–10622.

18. New M, Yau M, Lekarev O, Lin-Su K, Parsa A, Pina C, Yuen T and Khattab A. Congenital Adrenal Hyperplasia. Feingold KR, Anawalt B, Boyce A(editors). South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.

19. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A and New M. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet*. 1985; 37(4): 650–667.

20. Witchel SF. Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2017; 30(5): 520–534.

21. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med*. 2003;349:776–788.

22. Turcu AF and Auchus RJ. The Next 150 Years of Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015; 153: 63–71.

23. Tardy V, Menassa R, Sulmont V, Lienhardt-Roussie A, Lecointre C, Brauner R, David M, Morel Y. Phenotype-Genotype Correlations of 13 Rare CYP21A2 Mutations Detected in 46 Patients Affected with 21-Hydroxylase Deficiency and in One Carrier. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95 (3): 1288-300

24. White PC and Speiser PW. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Endocrine Reviews*, 2000;245–291

25. Speiser PW, Agdere L, Ueshiba H, White PC, New MI. Aldosterone synthesis in salt-wasting congenital adrenal hyperplasia with complete absence of adrenal 21-hydroxylase. *New England Journal of Medicine* 1991;324:145-9

26. Forest MG. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Reprod Update*. 2004;10(6):469-85

27. Zareba I and Palka J. Prolidase-proline dehydrogenase/proline oxidase-collagen biosynthesis axis as a potential interface of apoptosis/autophagy. *Biofactors*. 2016;8;42(4):341-8.

28. Pasko MC, Pałka J and Wojtukiewicz MZ. Enhanced prolidase activity and decreased collagen content in breast cancer tissue. *Int J Exp Pathol*. 2006; 87(4): 289–296.

29. Wilk P, Uehlein M, Kalms J, Dobbek H, Mueller U and Weiss MS. Substrate specificity and reaction mechanism of human prolylase. 2017;2870-2885.
30. Bhatnager R and Dang AS. Comprehensive in-silico prediction of damage associated SNPs in Human Prolidase gene. *Sci Rep.* 2018; 8: 9430.
31. Lowther WT and Matthews BW. Metalloaminopeptidases: Common functional themes in different structural environments. *Chem Rev.* 2002;102(12):4581-608
32. Alberto ME, Leopoldini M, Russo N. Can the human prolylase enzyme use different metals for full catalytic activity? 2011;50,3.394 - 3.403 .
33. Theriot CM, Tove SR and Grunden AM. Biotechnological applications of recombinant microbial prolylases. *Adv Appl Microbiol.* 2009;68 , 99 - 132.
34. Maher MJ, Ghosh M, Grunden AM, Menon AL, Adams MW, Freeman HC, Guss JM. Structure of the prolylase from *Pyrococcus furiosus*. 2004;2771–2783.
35. Lupi A, Tenni R, Rossi A, Cetta G, Forlino A. Human prolylase and prolylase deficiency: an overview on the characterization of the enzyme involved in proline recycling and on the effects of its mutations. *Amino Acids.* 2008;35, 739– 752.
36. Sipilä KH, Drushinin K, Rappu P, Jokinen J, Salminen TA, Salo AM, Kapyła J, Myllyharju J, Heino J. Proline hydroxylation in collagen supports integrin binding by two distinct mechanisms. *J Biol Chem.* 2018; 293(20): 7645–7658.
37. Rappu P, Salo AM, Myllyharju J, Heino J. Role of prolyl hydroxylation in the molecular interactions of collagens. *Essays Biochem.* 2019; 63(3): 325–335.
38. Surazynski A, Mityk W, Palka J, Phang JM. Prolylase-dependent regulation of collagen biosynthesis. *Amino Acids* (2008) 35, 731– 738.
39. Phang JM, Liu W, Zahirnyk O. Proline metabolism and microenvironmental stress. *Annu Rev Nutr* 2010;30, 441– 463.
40. Phang JM, Donald SP, Pandhare J, Liu Y. The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. *Amino Acids* 2008;35, 681– 690.
41. Aviel YB, Mandel H, Hersh EA, Bergman R, Adiv OE, Luder A, Brik R. Prolylase deficiency associated with systemic lupus erythematosus (SLE): single site experience and literature review. [Elektronik Journal] <https://doi.org/10.1186/1546-0096-10-18> June:2012
42. Mitsubuchi H, Nakamura K, Matsumoto S, Endo F. Prolylase Inborn errors of proline metabolism . *J Nutr* 2008. 138, 2016S - 2020S
43. Dyne K, Zanaboni G, Bertazzoni M, Cetta G, Viglio S, Lupi A, Iadarola P. Mild, late-onset prolylase deficiency: another Italian case. *Br J Dermatol* 2001. 144, 635– 636.

44. Cechowska-Pasko M, Palka J, Wojtukiewicz MZ. Enhanced prolidase activity and decreased collagen content in breast cancer tissue. *Int J Exp Pathol* 2006. 87, 289–296.
45. Demirbag R, Yildiz A, Gur M, Yilmaz R, Elci K, Aksoy N. Serum prolidase activity in patients with hypertension and its relation with left ventricular hypertrophy. *Clin Biochem* 2007. 40, 1020–1025.
46. Savas M, Yeni E, Celik H, Ciftci H, Utangac M, Oncel H, Altunkol A, Verit A. The association of serum prolidase activity and erectile dysfunction. *J Androl* 2010. 31, 146–154.
47. Reitznerová A, Sulekova M, Nagy J, Marcincak S, Semjon B, Certik M, Klempova T. Lipid Peroxidation Process in Meat and Meat Products: A Comparison Study of Malondialdehyde Determination between Modified 2-Thiobarbituric Acid Spectrophotometric Method and Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography *Molecules*. 2017; 22(11): 1988.
48. Kilic E, Yazar S, Saraymen R and Ozbilge H. Serum malondialdehyde level in patients infected with *Ascaris lumbricoides*. *World J Gastroenterol*. 2003; 9(10): 2332–2334.
49. Ayala A, Muñoz MF and Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 360438.
50. Hillemane V, Nayak Y and Jayashree BS. Evaluation of the Antioxidant Activity of Novel Synthetic Chalcones and Flavonols. 2012. 10.7763/IJCEA.2012.V3.189
51. Giera M, Lingeman H and Niessen W.M. A. Recent Advancements in the LC- and GC-Based Analysis of Malondialdehyde (MDA): A Brief Overview. *Chromatographia*. 2012; 75(9-10): 433–440.
52. Pham-Huy LA, He H and Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4(2): 89–96.
53. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J*. 2016; 15: 71.
54. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2018; 12(3): 88–93.
55. Fukai T and Ushio-Fukai M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15(6): 1583–1606. doi: 10.1089/ars.2011.3999
56. Erdem FH, Karatay S, Yildirim K, Kiziltunc A. Evaluation of serum paraoxonase and arylesterase activities in ankylosing spondylitis patients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010; 65(2): 175–179.

57. Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Paraoxonase 1: Implication in Arteriosclerosis Diseases. *N Am J Med Sci.* 2012; 4(11): 523–532.
58. Elkiran ET, Mar N, Aygen B, Gursu F, Karaoglu A ve Koca S. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. *BMC Cancer.* 2007; 7: 48.
59. Kilic SS, Aydin S, Kilic N, Erman F, Aydin S, Celik İ. Serum arylesterase and paraoxonase activity in patients with chronic hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2005 Dec 14; 11(46): 7351–7354.
60. Prakash M, Phani NM, Supriya M. Paraoxonase: Its antiatherogenic role in chronic renal failure. *Indian J Nephrol.* 2010 Jan-Mar; 20(1): 9–14.
61. Chinard FP. Photometric estimation of proline and ornithine. *J Biol Chem.* 1952 Nov;199(1):91-5.
62. Myara I, Charpentier C, Lemonnier A. Optimal conditions for prolidase assay by proline colorimetric determination: application to iminodipeptiduria. *Clin Chim Acta.* 1982;125(2):193-205.
63. Jain SK. Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochem Biophys Acta.* 1988;937:205-210.
64. Ligor M, Olszowy P, Buszewski B. Application of medical and analytical methods in Lyme borreliosis monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2012;402(7):2233-48.
65. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34:497-500.
66. Merke DP and Poppas DP. Management of adolescents with congenital adrenal hyperplasia. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2013; 1(4): 341–352.
67. Jones CM, Mallappa A, Reisch N, et al. Modified release and conventional glucocorticoids and diurnal androgen excretion in congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;15:jc20162855.
68. Modi AR, Dawson JH. Oxidizing intermediates in p450 catalysis: A case for multiple oxidants. *Adv Exp Med Biol.* 2015;851:63–81.
69. Bozkurt M, Caglayan M, Oktayoglu P, Em S, Batmaz İ, Sariyildiz MA, Nas K, Ucar D, Yüksel H, Sarac AJ. Serum prolidase enzyme activity and oxidative status in patients with fibromyalgia. *Redox Rep.* 2014; 19(4): 148–153.
70. Aktürk E, Askin L, Nacar H, Tasolar MH, Türkmen S, Cetin M, Bozkurt M. Association of serum prolidase activity in patients with isolated coronary artery ectasia. *Anatol J Cardiol.* 2018; 19(2): 110–116.
71. Cemek M, Dede S, Bayiroğlu F, Caksen H, Cemek F, Yuca K. Oxidant and antioxidant levels in children with acute otitis media and tonsillitis: a comparative study. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.* 2005, 69(6):823-827

72. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018;4; 217(6): 1915–1928.
73. Karatas F, Ozates I, Canatan H, Halifeoglu I, Karatepe M, Colakt R. Antioxidant status and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Indian J Med Res.* 2003;118:178-81.
74. Staron A, Makosa G, Michalak MK. Oxidative stress in erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2012; 32(2): 331–334.
75. Eren SH, Korkmaz I, Güven FM, Tekin YK, Ozdemir L. Serum Paraoxonase, Arylesterase, and Glutathione-S-Transferase Activities and Oxidative Stress Levels in Patients with Mushroom Poisoning. *Clinics (Sao Paulo).* 2018; 73: e16-550.
76. Shouman MG, Sabry S, Galal RE, Salama E, Wahby AA, Awadallah E, Selim A. Oxidative Stress in Hemodialysis Pediatric Patients. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019; 7(23): 3955–3959.
77. Koç S, Akyüz S, Somuk BT, Soyalic H, Yilmaz B, Taskin A, Bilinc H, Aksoy N. Paraoxonase Activity and Oxidative Status in Patients with Tinnitus. *J Audiol Otol.* 2016; 20(1): 17–21.

## 7. EK

### Ek 1: Etik Kurul Karar Formu

#### GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Konjenital Adrenal Hiperplazili Çocuklarda Serum Prolidaz Aktivitesinin Antioksidan Enzim Kapasitesiyle İlişkisi	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	415	
KARAR BİLGİLERİ	<b>Karar No:2019/415</b>	<b>Tarih: 13.11.2019</b>
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Aysun BARANSEL ISIR

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Aysun BARANSEL ISIR	ADLI TIP	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yasemin ZER	MİKROBİYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Özlem ALTINDAĞ	FİZİK TEDAVİ ve REHABILITASYON	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Birgül ÖZÇİRPİCİ	HALK SAĞLIĞI	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Muradiye NACAĞ	TIBBİ FARMAKOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İlker SEÇKİNER	ÜRÖLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mehmet KESKİN	ÇOCUK ENDOKRİNOLOJİ VE METABOLİZMA HASTALIKLARI	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sinan AKBAYRAM	ÇOCUK HEMATOLOJİ ve ONKOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ramazan BAL	FİZYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Umut ELBOĞA	NÜKLEER TIP	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Serkan GÜRGÜL	BİYOFİZİK	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Eda Didem YALÇIN	AĞIZ DIŞ ve ÇENE RADYOLOJİSİ	Gaziantep Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Gönül KARATAŞ DURUSOY	GÖZ HASTALIKLARI	Gaziantep Dr. Ersin Arslan Eğ. Arş. Hast.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Emine Aybiken YILDIRIM	AVUKAT (Hukukçu)	Gaziantep Barosu	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Hasan KİCİKOĞLU	OKUL ÖNCESİ ÖĞRETİMİ	Gaziantep Anaokulu	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

\*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Aysun BARANSEL ISIR

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ' KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Konjenital Adrenal Hiperplazili Çocuklarda Serum Prolidaz Aktivitesinin Antioksidan Enzim Kapasitesiyle İlişkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	415

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Araştırma Merkezi Binası (GAÜNDAM) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 27310 Şehitkamil/Gaziantep
	TELEFON	0342 360 12 00-Dahili 4800
	FAKS	-
	E-POSTA	etikkurul@gantep.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. İlal Geyikli ÇİMENÇİ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input type="checkbox"/>			
DİĞER İSE BELİRTİNİZ :					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>					
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	ILAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
DİĞER:	<input type="checkbox"/>						

Etik Kurul Başkanı'nın  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Aysun BARANŞEL İSİR

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

## ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında Şanlıurfa'nın Birecik ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Birecik'te tamamlayarak, 2013 yılında Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya bölümüne başladı, 2018 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2018 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

