

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

FENİLKETONÜRİLİ HASTALARDA PROLİDAZ
ENZİM AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Meryem KOYUNCU

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten AKSOY

ŞANLIURFA
2010

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

FENİLKETONÜRİLİ HASTALARDA PROLİDAZ
ENZİM AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Meryem KOYUNCU

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten AKSOY

Bu Tez Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 903 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA
2010



T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Sayı :
Konu : Yüksek Lisans Tez Savunma Sınav Sonucu

Tarih : 28/01/2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Tıp Yüksek Lisans Programı 075302003 No'lu öğrencisi Meryem KOYUNCU'nun Tez Savunma Sınav Tutanağı aşağıdadır.

Gereği için bilgilerinize arz ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI

Jürimiz 27/01/2010 tarihinde toplanmış ve yukarıda adı geçen öğrencinin “Fenilketonüri Hastalarda Prolidaz Enzim Aktivitesinin Araştırılması” isimli yüksek lisans tezinin savunma sınavı sonucunda **Oy Birliği** ile aşağıdaki kararı almıştır.

- Tez değerlendirme hakkındaki kişisel raporların incelenmesi ve yapılan savunma sınavında adayın başarılı bulunması sonucunda tez **KABUL** edilmiştir.
- Tez değerlendirme hakkındaki kişisel raporların incelenmesi ve yapılan savunma sınavı sonucunda tezin **DÜZELTİLMESİ** için ay **EK SÜRE** verilmesinin Enstitü Müdürlüğüne önerilmesi kararı alınmıştır.
- Tez değerlendirme hakkındaki kişisel raporların incelenmesi ve yapılan savunma sınavının sonucunda tezin **REDDEDİLMESİ** kararı alınmıştır.

Tez Sınavı Jürisi	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT	
Üye (Danışman)	Prof. Dr. Nurten AKSOY	
Üye	Doç. Dr. Seyithan TAYSI	
Üye		
Üye		

Tüm durumlarda jüri üyelerinin kişisel raporları gerekir.

TEŞEKKÜR

Önlisans öğrenimim sırasında bana biyokimyayı sevdiren, teşvik ve yönlendirmeleriyle lisans öğrenimime devam etmemde, yüksek lisans eğitimi ve tez hazırlık aşamasındaki katkılarından dolayı değerli danışman hocam Prof. Dr. Nurten AKSOY'a, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT'e, Prof. Dr. Özcan EREL'e, desteklerinden dolayı Uzm. Dr. Hale ÇAKIR'a, ders döneminde ve laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı arkadaşım Abdullah TAŐKIN'a, Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya laboratuvarı çalışanlarına, hastalara ulaşma konusundaki yardımlarından dolayı Şanlıurfa İl Sağlık Müdürlüğüne, maddi desteklerinden dolayı Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Kurumu HÜBAK'a (proje no 903), kan örneklerinin alınması sırasında bana refakat eden arkadaşlarıma, maddi manevi desteklerinden dolayı aileme ve eşime içtenlikle teşekkür ederim.

Meryem KOYUNCU

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
TABLO DİZİNİ.....	III
ŞEKİL DİZİNİ.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. GİRİS VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Fenilketonüri.....	3
2.1.1. Fenilketonürinin Tarihçesi.....	3
2.1.2. Fenilketonürinin Görülme Sıklığı.....	3
2.1.3. Fenilalanin Metabolizması.....	4
2.1.4. Hiperfenilalaninemi Tipler.....	5
2.1.5. Diğer Hiperfenilalaninemi Tipleri.....	10
2.1.6. FKÜ de Klinik Bulgular.....	11
2.1.7. FKÜ de Tarama ve Tanı Testleri.....	13
2.1.8. FKÜ Tedavisi.....	17
2.2. Prolidaz.....	18
2.2.1. Prolidazın Tanımı.....	18
2.2.2. Prolinin Yapısal Özellikleri ve Önemi.....	18
2.2.3. Prolidazın Yapısı.....	21
2.2.4. İnsan Prolidazının Primer Yapısı ve Gen Lokalizasyonu.....	22
2.2.5. Prolidazın İzoenzimleri.....	23
2.2.6. Prolidazın İnhibitör ve Aktivatörleri.....	25
2.2.7. Prolidazın Kollajen Yapım ve Yıkımında Önemi.....	26
3. MATERYAL METOD.....	29
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	29
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
3.3. Örneklerin Hazırlanması.....	30
3.4. Serum Prolidaz Aktivitesi Ölçüm (Optimize Chinard) Yöntemi.....	30
3.5. Prolidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan Ayıraçlar.....	31
3.6. Prolidaz Aktivitesinin Hesaplanması.....	32

4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
6. KAYNAKLAR.....	40

TABLO DİZİNİ

Tablo1: Türkiye ve bazı ülkelerde fenilketonüri görülme sıklığı.....	4
Tablo 2: Normal plazma ($\mu\text{mol/L}$), idrar (nmol/mmol kreatinin) ve beyin-omurilik sıvısı ($\mu\text{mol/L}$) fenilalanin düzeyleri.....	7
Tablo 3: Hiperfenilalaninemi tipleri.....	8
Tablo 4: FKÜ'lü hastaların bazı klinik ve laboratuvar özellikleri.....	13
Tablo 5: FKÜ taramasında kullanılan yöntemler.....	15
Tablo 6: İnsan prolidaz I ve prolidaz II izoenzimlerinin doku dağılımları (%) (25).....	23
Tablo 7: FKU ve Kontrol grubunun Prolidaz Enzim Aktiviteleri arasındaki ilişki.....	33
Tablo8: Hasta ve kontrol grupları arasındaki prolidaz parametreleri.....	33

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Fenilalanin metabolizması.....	5
Şekil 2: Yenidoğandan tarama amaçlı Guthrie kağıdına kan alımı.....	14
Şekil 3: Prolin ve diğer bir amino asidin yapısal görünümü.....	18
Şekil 4: Memeli kollajeninde bulunan prolin ve hidroksiprolin izomerleri.....	20
Şekil 5: Prolinin metabolik yollarla bağlantısı.....	20
Şekil 6: Prolidaz genini içeren kromozom	22
Şekil 7: Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinazın yeri.....	27
Şekil 8: Hasta ve kontrol grupları arasında serum prolidaz aktivitelerinin karşılaştırılması	34

ÖZET

Ülkemizde akraba evliliği oranının yüksek olması nedeniyle doğumsal metabolizma hastalıkları sık görülmektedir. Fenilketonüri (FKÜ) en sık karşılaşılan otozomal resesif kalıtmı Fenilalanin hidroksilaz (FAH) eksikliği sonucu meydana gelen bir aminoasit metabolizma hastalığıdır. Yaklaşık 3.000-4.000 yenidoğanda bir görülmektedir. Bu enzimin eksikliği veya yokluğu mental retardasyon, organ hasarları, postur bozuklukları ve maternal fenilketonüri durumlarında ise gebeliğin ciddi şekilde riskli olması ile sonuçlanır.

FAH enzimi, fenilalaninin tirozine hidroksilasyonunu katalizleyen hepatik bir enzimdir . Klasik FKÜ kromozom 12'de bulunan FAH geninin her iki alellerinde mutasyon olması sonucu meydana gelir. FAH geninin her iki kopyasında da mutasyon olunca bu enzim ya inaktif ya da normale göre daha az aktif hale gelir ve bu da vücutta fenilalanin konsantrasyonunun toksik seviyelere ulaşmasına neden olur. Bazı vakalarda FAH'daki mutasyonlar hiperfenilalaninemi diye bilinen fenotipik olarak orta derecede bir FKÜ meydana getirir.

Fenilketonüri erken teşhis edildiğinde tedavi edilebilen bir hastalıktır. Dikkatli bir diyetle FKÜ'li çocuklar normal hayatlarına devam edebilir ve gebe annelerde sağlıklı çocuklar doğurabilirler. Tedavide genel ilke gıdalar ile alınan fenilalanin miktarını azaltarak kan fenilalanin düzeyini normal sınırlar içinde tutmaktır. Aksi taktirde vücutta oluşan fenilalanin metabolitleri pek çok organ ve dokuda çeşitli proteinlerin sentez ve fonksiyonlarını bozabilmektedir. Vücudumuzda bulunan en yaygın proteinlerden biri olan kollajen proteininin metabolizmasının bu metabolik hastalıktan etkilenip etkilenmediği henüz bilinmemektedir. Biz bu çalışmamızda kollajen turnoverinde önemli bir yeri olan prolidaz aktivitesini FKÜ'li hastalarda inceleyip yaş, kilo ve cinsiyet olarak uyumlu sağlıklı kişilerden oluşan kontrollerle de mukayese ederek bu konuya ışık tutmayı amaçladık.

Çalışmamızda yenidoğan tarama testi (Guthrie testi) şüpheli bulunan ve kontrol testleriyle hastalığı kesinleşen 30 fenilketonüri hastası ile 30 sağlıklı bireyin serum prolidaz aktiviteleri Özcan ve arkadaşları tarafından optimize edilmiş modifiye Chinard metodu ile ölçüldü. Sonuç olarak serum prolidaz aktivitesi fenilketonüri hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük seviyede bulundu ($p<0,001$).

Bulgularımız ışığında fenilketonüri hastalığında kollajen metabolizmasının etkilendiğini ve turnoverinin anlamlı olarak azaldığını söyleyebiliriz.

Anahtar kelimeler: Fenilketonüri, Prolidaz, Kollajen, Prolin

ABSTRACT

In our country, congenital metabolic diseases are very common since the ratio of marriage between relatives is high. Phenylketonuria (PKU) is the most common autosomal recessive metabolism disorder caused by a deficiency in the enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH). It seems approximately one in 3.000-4.000 newborn. Loss or deficiency of this enzyme results in mental retardation, organ damage, unusual posture and can, in cases of maternal PKU, severely compromise pregnancy.

PAH enzyme converts the amino acid phenylalanine to tyrosine, another amino acid, in the liver. Classical PKU is caused by mutations in both alleles of the gene for phenylalanine hydroxylase (PAH), found on chromosome 12. Mutations in both copies of the gene for PAH means that the enzyme is inactive or is less efficient, and the concentration of phenylalanine in the body can build up to toxic levels. In some cases, mutations in PAH will result in a phenotypically mild form of PKU called hyperphenylalanemia. PKU may be treated if diagnosed early. With careful dietary supervision, children born with PKU can lead normal lives, and mothers who have the disease can produce healthy children. In the treatment general principle is to lower dietary phenilalanine intake and to regulate blood phenialanin levels in normal range. Otherwise, phenilalanine metabolites formed in the body damage biosynthesis and functions of many proteins located in several tissue and organs. It is still unknown that whether the metabolism of collagen protein which is one of the most common proteins in human body has been affected by this disease. In this study, we aimed to examine Prolidase enzyme activity in the patients with PKU and to compare them with controls including age, weight and sex-matched healthy persons.

In the present study, we measured serum Prolidase activities of 30 patients with PKU which diagnosed certainly with control tests after having positive newborn screening test (Guthrie testi) for PKU, and 30 healthy person by using modified Chinard method which optimized by Ozcan et al. As a result, serum Prolidase activities were found significantly lower in the patients' group than those in the controls' group.

In the light of these findings it is possible to conclude that collagen metabolism is affected by this disease and its turnover decreased significantly.

Key words: Phenylketonuria, Prolidase, Collagen, Prolin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fenilketonüri Türk popülasyonunda görülme oranı en yüksek ve diyet tedavisi ile önlenebilen önemli tek gen hastalıklarından birisidir. Fenilketonüri hastalığı, Fenilalanin amino asidinin (FA) tirozine dönüşümünü sağlayan fenilalanin hidrosilaz enziminde (FAH) veya bu enzimin kofaktörü olan tetrahidrobiopterinin (BH₄) sentez ve rejenerasyonundan sorunlu olan diğer enzimlerdeki bozukluğa bağlı olarak ortaya çıkan heterojen hastalık grubudur. Bu nedenle hiperfenilalaninemiler olarak adlandırılmaktadır. Tirozine dönüştürülemeyen fenilalanin amino asidindeki NH₂ grubu, transaminazlar tarafından α -ketoglutarat'a transfer edilerek fenilpürivat oluşmasına neden olmaktadır. Transaminasyon sonucu oluşan fenilpürivat ise, fenillaktik asit, fenilasetat, feniletilamin, fenilasetil glutamin gibi metabolitler oluşturur. Fenilalanin ve metabolitleri hastanın kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında birikir. Özellikle beyinde biriken fenilalanin çocuğun gelişmekte olan beyinde geri dönüşümsüz ve ilerleyici hasara neden olarak ileri derecede zihinsel özürü olmasına ve sinir sistemini ilgilendiren daha birçok belirtilerin ortaya çıkmasına neden olur. Kanda fenilalanin düzeyi normalde %1-2 mg kadar olduğu halde fenilketonüride %15-63 mg'a kadar yükselir ve idrarda normalde %30 mg kadar olan fenilalanin, fenilketonüride %300-1000 mg kadar olabilir.

Fenilketonüri erken teşhis edildiğinde tedavi edilebilen bir hastalıktır. İlk bir ay içinde tedavisi başlamış ve düzenli olarak sürdürülmüş fenilketonürüli çocuklar tamamen sağlıklı olarak büyürler Tedavide genel ilke gıdalar ile alınan fenilalanin miktarını azaltarak kan fenilalanin düzeyini normal sınırlar içinde tutmaktır. Diyet tedavisinde fenilalanini çok azaltılmış ya da fenilalanin içermeyen özel ve ilaç niteliğinde mamaların ve tıbbi ürünlerin kullanılması gereklidir. Fenilketonürinin tedavisinde amaç, mental gerilik oluşturan beyin hasarını önlemektir. Bunun için de diyetdeki fenilalanin, kan fenilalanin düzeyi %3-12 mg olacak şekilde azaltılır. Tedavi en az beyin dokusunun en hızlı geliştiği hayatın ilk 8-10 yılı boyunca çok iyi şekilde uygulanmalıdır.

Fenilketonüri hastalığı ile doğan bebeğin, beyni etkilenmeden, erken olarak tanınması çok önemlidir. Bu amaçla geliştirilmiş her yenidoğan çocuğa uygulanabilen bir tarama testi vardır. Doğumdan 72 saat sonra özel bir filtre kağıdına alınan 2 damla kan teşhis için yeterlidir. Hasta bebek hayatın ilk günlerinde tanındığında uygun diyet tedavisi ile zeka geriliği önlenemediği için gelişmiş ülkelerde tüm yenidoğanların fenilketonüri yönünden taranması zorunluluğu vardır.

FKÜ tanısı klasik tanı teknikleri ile ancak doğum sonrasında teşhis edilebilirken, başdöndürücü bir hızla gelişen moleküler tanı teknikleri ile bugün prenatal tanı ve taşıyıcı tesbiti yapılabilmektedir.

FKÜ hastaları hayatlarının erken dönemlerinde teşhis edildikleri takdirde, fenilalaninden kısıtlı bir diyet uygulaması ile oluşabilecek beyin hasarı önlenebileceğinden, tarama ve prenatal tanı teknikleri çok büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışmada amacımız, fenilalanin metabolitlerinin artmasına bağlı olarak yapı ve fonksiyonu hasarlanan pekçok proteinin gösterildiği fenilketonüri hastalarda kollajen protein metabolizmasının etkilenip etkilenmediğini, bu proteinin özellikle yıkım basamağında ve dolayısıyla kollajen turnoverinde rol alan prolidaz enzim aktivitesinde bir değişiklik olup olmadığını inceleyerek ortaya koymaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Fenilketonüri

2.1.1. Fenilketonürinin Tarihçesi

Fenilketonüri ilk kez 1934 yılında Asbjörn Fölling (1888-1937) isimli Norveçli bir hekim tarafından 10 ağır mental retardasyonlu ve postnatalhiperfenilalaninemi olan, zihinsel geri olan sarışın, mavi gözlü iki kardeşte hastaya kendi isimlendirdiği “Imbecilites phenylpyruvica” olarak tanımlanmıştır. Daha sonra 1946’da Penrose ve Quastel hastalığa fenilketonüri ismini vermişlerdir. İdrarda bulunan fenilketonun fenilpirüvat olduğu anlaşılmeden önce hastalık isimlendirilmiştir.(1)

2.1.2.Fenilketonürinin Görülme Sıklığı

Fenilketonüri Türk popülasyonunda görülme oranı en yüksek ve diyet tedavisi ile önlenebilen önemli tek gen hastalıklarından birisidir. Avrupa ülkelerindeki insidansı ortalama 1/10.000 iken (Almanya 1/9.000, İngiltere 1/10.000, Fransa 1/18.000, İtalya 1/7000) hastalığın ülkemizde görülme sıklığı diğer ülkelere göre çok yüksek olup, insidansı 1/4500 olarak rapor edilmiştir (2). (Tablo 1). Her yıl ülkemizde 250-300 çocuk bu hastalıkla doğmaktadır. Her 20-25 kişiden birinin hastalığı taşıyor olması ve ülkemizde akraba evliliklerinin yüksek oranda yapılması fenilketonürinin sık görülmesine neden olmaktadır (3).

Tablo1: Türkiye ve bazı ülkelerde fenilketonüri görülme sıklığı

Ülke	Sıklık
Türkiye	1:4500
U.S.A	1:13000
U.K	1:10000
Almanya	1:9000
İrlanda	1:6110
İtalya	1:7000
Fransa	1:18800
Çin	1:20000
Japonya	1:60000
Finlandiya	1:71000

2.1.3. Fenilalanin Metabolizması

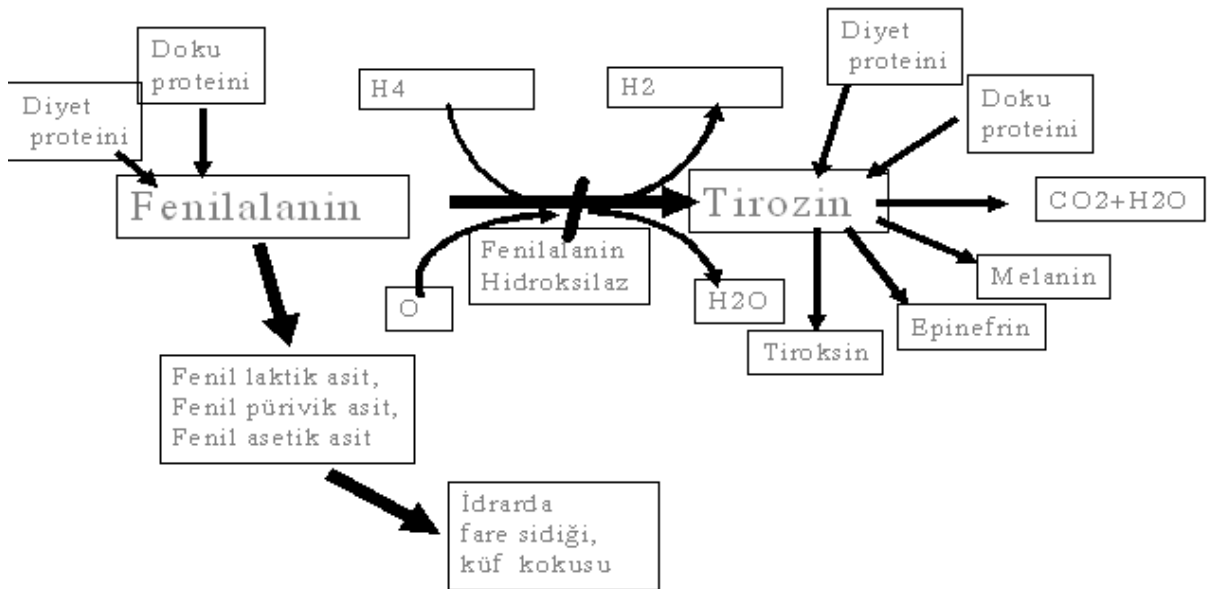
Fenilalanin esansiyel bir aminoasittir. Fenilalanin beyinde norepinefrin, dopamin, epinefrin, adrenalin, tiroid hormon yapımı yanı sıra önemli nöropeptidlerin, somatostatin, vazopressin, melanotropin, adrenokortikotropik hormon, substans P, enkefalin, vazoaktif intestinal peptid, anjiyotensin II ve kolesistokinin yapımıyla da ilgilidir (4).

Protein sentezinde kullanılmayan diyetsetel fenilalaninin % 75'i karaciğerde fenilalanin hidroksilazın katalitik etkisiyle geri dönüşümsüz olarak tirozine dönüşür (5,6). Fenilalanin hidroksilaz ve tetrahidrobiopterin eksikliği vücut sıvılarında fenilalanin birikmesine neden olur.

Tirozine dönüştürülemeyen fenilalanin amino asidindeki NH₂ grubu, transaminazlar tarafından α -ketoglutarat'a transfer edilerek fenilpirüvat oluşmasına neden olmaktadır (Sekil 1). Fenilpirüvat da kanda ve dokularda birikir, idrarla atılır ayrıca transaminasyon sonucu oluşan fenilpirüvat, fenillaktik asit, fenilasetat, feniletilamin, fenilasetil glutamin gibi metabolitlerin oluşumuna neden olur ve hastanın kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında birikir (7).

Serumda fenilalanin ve fenilpirüvik asit metabolitlerinin artması hiperfenilalaninemilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Kanda aşırı biriken fenilalanin, kan-beyin bariyerini geçmek için diğer amino asitlerle yarışır ve beyinde bazı gerekli metabolitlerin azalmasına neden olur. Bu metabolitlerin beyin dokusunda diğer aminoasitlerin transportunu bozarak dismyelinizasyona neden olduğu düşünülmektedir. Tedavi edilmezse seratonin, dopamin ve norepinefrin sentezi bozulmaktadır (8).

Ayrıca vücut sıvılarında artan fenilalanin, diğer amino asitlerin gastrointestinal kanaldan emilimini ve böbreklerden geri emilimini de baskılar ve sonuçta tirozin ile birlikte diğer amino asitler de vücut sıvılarında azalır (8).



Şekil 1: Fenilalanin metabolizması

2.1.4. Hiperfenilalaninemi Tipleri

Fenilketonüri hastalığı, Fenilalanin amino asidinin tirozine dönüşümünü sağlayan fenilalanin hidroksilaz enziminde veya bu enzimin kofaktörü olan tetrahidrobiopterinin sentez ve rejenerasyonundan sorumlu olan diğer enzimlerdeki bozukluğa bağlı olarak ortaya çıkan heterojen hastalık grubudur. Bu nedenle hiperfenilalaninemiler olarak adlandırılmaktadır (9). HFA, kan-beyin bariyeri ve hücre membranlarından aromatik ve diğer aminoasitlerin her iki yönlü geçişini kompetitif olarak engeller. Beyindeki yüksek fenilalanin düzeyi protein sentez hızını azaltır. Dendritik proliferasyonun erken dönemi ve miyelinizasyon etkilenir. Adenozin trifosfat (ATP) sülfirilaz inhibe olarak miyelin yıkımı artar. Tirozin ve triptofan hidroksilasyonunun kompetitif inhibisyonu ve intranöronal substrat konsantrasyonunun azalması sonucu serotonin, dopamin ve norepinefrin sentezi azalır (8). Çocuklarda normal kan fenilalanin düzeyleri (ortalama 8 yaş dolayında) $62 \pm 18 \mu\text{mol/L}$, ergenlerde (ortalama 16 yaş dolayında) $60 \pm 13 \mu\text{mol/L}$, erişkinlerde normal kan fenilalanin düzeyleri ise $58 \pm 15 \mu\text{mol/L}$ 'dir. Ergen erkeklerin kan fenilalanin düzeyleri kızlarınkinden biraz daha yüksektir. Yenidoğan ve daha büyük çocuklarda normal kan fenilalanin düzeyleri erişkinlerdeki gibidir (Tablo 2.).

Tablo 2. Normal plazma ($\mu\text{mol/L}$), idrar (nmol/mmol kreatinin) ve beyin-omurilik sıvısı ($\mu\text{mol/L}$) fenilalanin düzeyleri

Plazma	
• Çocuklarda	26-98 $\mu\text{mol/L}$
• Ergenlerde	34-86 $\mu\text{mol/L}$
• Erişkinler	
> Kadınlarda	42-62 $\mu\text{mol/L}$
> Erkeklerde	46-74 $\mu\text{mol/L}$
İdrar	
• 0-1 ay	4-3 nmol/mmol kreatinin
• 1-6 ay	7-28 nmol/mmol kreatinin
• 6-12 ay	11-28 nmol/mmol kreatinin
• 1-2 yaş	10-31 nmol/mmol kreatinin
• 2-4 yaş	7-21 nmol/mmol kreatinin
• 4-7 yaş	6-26 nmol/mmol kreatinin
• 7-13 yaş	5-20 nmol/mmol kreatinin
• >13 yaş	2-19 nmol/mmol kreatinin
Beyin-omurilik sıvısı	
• Kadınlarda	10.8 (2.4-19.2) $\mu\text{mol/L}$
• Erkeklerde	12.5 (6.7-18.3) $\mu\text{mol/L}$

Kan fenilalanin düzeyi >2 mg/dl (>120 $\mu\text{mol/L}$)'nin üzerinde bulunduğu hiperfenilalaninemi varlığından söz edilebilir (4). Tablo. 3'de primer ve sekonder hiperfenilalaninemi tipleri ve nedenleri verilmiştir.

Tablo 3. Hiperfenilalaninemi tipleri ve nedenleri

1. Primer (kalıtsal)	2. Sekonder (edinsel)
Fenilalanin hidroksilaz eksikliği <ul style="list-style-type: none">• Ağır (klasik FKÜ)• Orta ağırlıkta hiperfenilalaninemi• Hafif hiperfenilalaninemi Biopterin metabolizması bozuklukları <ul style="list-style-type: none">• Guanozin trifosfat siklohidrolaz eksikliği• 6-piruvoil- tetrahidropterin sentaz eksikliği• Dihidropteridin redüktaz eksikliği• Pterin karbinolamin dehidrataz eksikliği• Semiapterin redüktaz eksikliği	Maternal FKÜ Tirozinemi Geçici neonatal hiperfenilalaninemi İlaça bağlı (metotreksat, trimetoprim) Ağır enflamatuvar yanıt Renal hastalık Karaciğer hastalığı

Kalıtsal hiperfenilalaninemiler de tedavi öncesi kan fenilalanin düzeyi ve hastaların tolere edebildikleri fenilalanin miktarları dikkate alınarak 3 grup altında sınıflandırılmaktadır (9).

2.1.4.1. Fenilketonüri

2.1.4.1.1. Klasik Fenilketonüri

Olguların yaklaşık %50 kadarını oluşturur (7). Bu bozuklukta Fenilalanin hidroksilaz enziminin aktivitesi tamamen kaybolmuştur. Fenilalanin tirozine çevrilemez. Para pozisyonunda hidroksilasyonun olmayışının direkt sonucu olarak fenilalanin kanda, idrarda ve beyin omurilik sıvısında birikir. Biriken aşırı fenilalanin transaminasyon ile fenilpiruvik aside, dekarboksilasyon ile feniletlenamine dönüşür. Aşırı fenilalanin ve metabolitleri beyin normal metabolizmasını bozarak beyin harabiyetine yol açar. Bu metabolitler böbrekler tarafından hızla uzaklaştırılır ve idrarla dışarı atılır.

Fenilalanin hidroksilaz enzim aktivitesi <%1 olup, kan fenilalanin düzeyi >20 mg/dl (>1200 µmol/L) dir. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı 20 mg/kg dır.

2.1.4.1.2. Orta Derecede "Moderate" Fenilketonüri

Fenilalanin hidroksilaz enzim aktivitesi >%1 olup, kan fenilalanin düzeyi 15-20 mg/dl (900-1200 µmol/L) dir. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı 20-25 mg/kg dır.

2.1.4.1.3. Hafif "Mild" Fenilketonüri

Fenilalanin enzim aktivitesi >% 5 olup, kan fenilalanin düzeyi 10-15 mg/dl (600-900 µmol/L) dir. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı 25-50 mg/kg dır.

2.1.4.2. Hafif "Mild" Hiperfenilalaninemi

Fenilalanin hidroksilaz enzim aktivitesi >% 30 olup, kan fenilalanin düzeyi <10 mg/dl (<600 µmol/L) dir.

2.1.4.3. Kofaktör Tetrahidrobiopterin (BH₄) Eksikliğine Bağlı Hiperfenilalaninemi

Hiperfenilalaninemilerin %2'sini oluşturur. BH₄ üretiminde rol alan enzimlerin birisi (Dihidropteridin redüktaz, 6-piruvoyl sentetaz, GTP siklohidrolaz) eksiktir. BH₄ fenilalanin, tirozin ve triptofan hidroksilaz enzimlerinin kofaktörüdür. Tirozin ve triptofan hidroksilaz, dopamin ve serotonin sentezinde esansiyel enzimlerdir. Günümüzde hiperfenilalaninemisi saptanan hastalarda BH₄ düzeylerine bakılarak erkenden tanı konulabilir.

2.1.5. Diğer Hiperfenilalaninemi Tipleri

2.1.5.1. Benign Hiperfenilalaninemi

İnfantın kan fenilalanin düzeyinin 20 mg/dl'den daha az olmak üzere yükselmesi ve idrarda fenilpiruvik asidin atılmasıdır. Hastalarda fenilalanin hidroksilaz enziminin kısmi eksikliği vardır. Residüel enzim aktivitesi %1-35 arasındadır. Tarama testlerinde tanı konulur. Diyetsiz de hastaların gelişimleri normaldir. Serum fenilalanin düzeyi 10-20 mg/dl arasında seyreder. Diyetten protein kısıtlanır.

2.1.5.2. Geçici Neonatal Hiperfenilalaninemi

Bu bozukluk, karaciğerde fenilalanin hidroksilaz enzim sisteminin gecikmiş gelişimine bağlıdır. Kalıtsal değildir ve kan fenilalanin düzeyleri ilk zamanlar 12 mg /dl yi geçebilir; ancak yenidoğan geliştikçe derece derece normal düzeylere iner. Hiperfenilalanineminin daha az ciddi formları (FKU varyantları olarak da adlandırılır.) fenilalanin hidroksilaz enzimidaki kısmi eksikliğe bağlı olarak meydana gelir. Tipik bir varyant da fenilalanin hidroksilaz aktivitesi normalin %6 sından daha azdır ve ketonüri görülebilir veya görülmeyebilir (13).

2.1.5.3. Maternal Fenilketonüri

Fenilalaninden düşük diyetle beslenmeyen fenilketonürlü bir kadın hamileliği sırasında bebek etkilenerek maternal Fenilketonüri sendromu oluşur. Maternal HFA'da erken gebelik döneminden itibaren fetal/maternal fenilalanin oranı yüksektir. Plasental transportta fenilalanin diğer nötral aminoasitlerle yarışa girerek fetüsün büyümesini yavaşlatır, organların normal gelişimini engeller. Fetüste anomali sıklığı, anne kan fenilalanin düzeyi ile ilişkilidir. Hiperfenilalaninemik annelerden doğan çocukların %80'nden fazlasında düşük doğum tartısı, mikrosefali, dismorfik yüz görünümü, gelişme geriliği, kalp ve büyük damarları ilgilendiren doğuştan malformasyonlar gibi bulgular gelişmektedir. Fetüste anomali sıklığı anne kan fenilalanin düzeyi ile ilişkilidir.(10). Bu yüzden gebelik öncesi diyet kontrolü ile fenilalanin düzeyleri düşürülür.

2.1.6. Fenilketonüride Klinik Bulgular

Hastalık konvülsiyonlar, mikrosefali, egzema ve skleroderma benzeri deri lezyonları, bazı hastalarda saç ve göz renginin açık olması ve özel bir idrar kokusu (küf kokusu) ile karakterizedir (4,11,12).

Hastaların yarısında ilk ayda semptom görülmeyebilir. Semptom gösteren vakaların yarısında ilk bulgu kusmadır. Motor-mental gerilik en çarpıcı bulgudur. 6-7. aylarda fark edilir. Fenilketonların beyinde serotonin enzimatik sentezini engellemelerine bağlı olarak düşük serotonin düzeyinin bu hastalardaki zeka kusurlarının nedeni olabilir. Ayrıca fenilglutaminin oluşumunda fazla glutamin kullanılmasına bağlı olarak, kronik glutamin azlığının beyin hasarında doğrudan etkili olabileceği ileri sürülmektedir.

Genel olarak altı ay civarında FKÜ'li çocuğun akranlarından geri olduğu fark edilmeye başlanır. Fenilketonürili çocukta baş kontrolü, oturma ve yürüme evreleri gecikir. Çocuk etrafla ilgisizdir (4). Daha büyük çocuklarda ciddi hiperaktivite, çevresine ve kendisine zarar verme, şizofrenoid ve aşırı heyecanlanma otizm tarzında davranış bozuklukları, amaçsız hareketler, ritmik sallanma ve titreme görülebilir. Beyinde gelişen kusurlu miyelinizasyon yüzünden sık epileptik nöbetler görülmektedir. Nörolojik bulgular, diyet ve antikonvülsan tedaviye cevap verir.

EEG değişiklikleri (%75-95), yürürken adımlarının kısa ve rijit olması, minimal beyin sendromunu taklit eden bulgular, ajite davranışlar ve parmaklarda para sayma hareketi, mikrosefali görülür.

Saç, cilt ve göz rengi açıktır. Sarı saç ve mavi göz vakaların ancak %60 'ında bulunur. Deri ve saçtaki hipopigmentasyon artan fenilalanin konsantrasyonu ile tirozin hidroksilazın kompetitif inhibisyonu yüzündendir. Tirozin hidroksilaz aktivitesinin inhibisyonu, tirozinin DOPA'ya dönüşümünü ve melanin oluşumunu önler. Böylece etkilenmiş ve tedavi edilmemiş bireyler mavi gözlü, kumral saçlı ve açık tenli olurlar (13,14).

Ekzematöz cilt lezyonları (%20-40) vücudun duyarlı yerlerinde görülür. Vakaların %20 sinde cilt hipopigmente, kuru ve pürüklüdür. Doğuştan kalp hastalıkları FKÜ'de genel popülasyondan daha yaygındır (15). Birçok çalışma FKÜ'li bireylerin yüksek osteopeni insidansına sahip olduğunu göstermiştir (16,17). Fenilalanin yan metaboliti fenilasetik asitin sıvılarda ve idrarda artmasına bağlı fare sidiği, küf kokusu hissedilir.

Tedavi edilmemiş fenilketonürlü çocuk ve yetişkin IQ'larının 40 olduğu ve sadece %4 ya da daha azının IQ'sunun 60'ın üzerinde olduğu bilinmektedir (14). Fenilketonürlü bireyler yaşamlarının ilk yılında tedavi edilmezlerse IQ'larında 50 puan azalma olduğu hesaplanmıştır (18).

Defektif miyelin oluşumuna, nörolojik anormalliklere ve zeka geriliğine neden olan mekanizma tam olarak bilinmiyor. Fakat fenilalanin ve ürünlerinin birikimi sonucu sinir sistemindeki metabolik yolların işleyişinde herhangi bir bozukluk ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (19).

FKÜ beyindeki ana nörotransmitterlerden biri olan dopamin üretimine de etki eder. Beyin, dopamini tirozin amino asidinden yapar. Diyetlerinde yeterli tirozin tüketmeyen FKÜ hastaları yeterli miktarda dopamin üretemezler. Beyindeki düşük dopamin seviyeleri (zayıflamış kognitif fonksiyon ile sonuçlanan) sinir hücreleri arasındaki normal iletişimi bozar ve bu zayıflamış mental fonksiyon ile sonuçlanır. Bazı çalışmalar gösteriyor ki FKÜ hastalarının sinir hücreleri de tirozini absorbe etmekte zorluk çekiyor. Bu anormallik, yeterli tirozin diyeti alan bazı hastaların neden hala öğrenme güçlüğü çektiğini gösteriyor (20).

Tablo 4. Fenilketonürlü hastaların bazı klinik ve laboratuvar özellikleri

Nörolojik	Mental retardasyon, amaçsız stereotipik hareketler, konvülsiyon, miyelin oluşumunda bozukluk
Baş	Mikrosefali
Deri	Açık renk, kuruluk, egzema, skleroderma benzeri lezyonlar
Saçlar	Açık renk
Gastrointestinal	Yenidoğan döneminde kusma
Gözler	Açık renk gözler, bazı vakalarda katarakt
Diğer	İdrarda küf kokusu
Radyolojik	Beyinde kalsifikasyon
Laboratuvar	Fenilalanin hidroksilaz eksikliği, Hiperfenilalaninemi, fenilpirüvik asidemi, idrarda hidroksifenilasetik asit, fenilpirüvik asit, fenilasetik asit ve fenilasetilglutamin atılımında artma

2.1.7. Tarama ve Tanı Testleri

Fenilketonürinin erken tanısı ve mental gerilik oluşturan beyin hasarının önlenmesi için idrar veya kan tarama testi yapılır. Fenilketonüri hastalığı ile doğan bebeğin, beyni etkilenmeden, erken olarak tanınması çok önemlidir. Bu amaçla geliştirilmiş her yenidoğan çocuğa uygulanabilen bir tarama testi vardır. Doğumdan 72 saat sonra özel bir filtre kağıdına alınan 2 damla kan teşhis için yeterlidir. Hasta bebek hayatın ilk günlerinde tanındığında uygun diyet tedavisi ile zeka geriliği önlenemediği için gelişmiş ülkelerde tüm yenidoğanların fenilketonüri yönünden taranması zorunluluğu vardır.

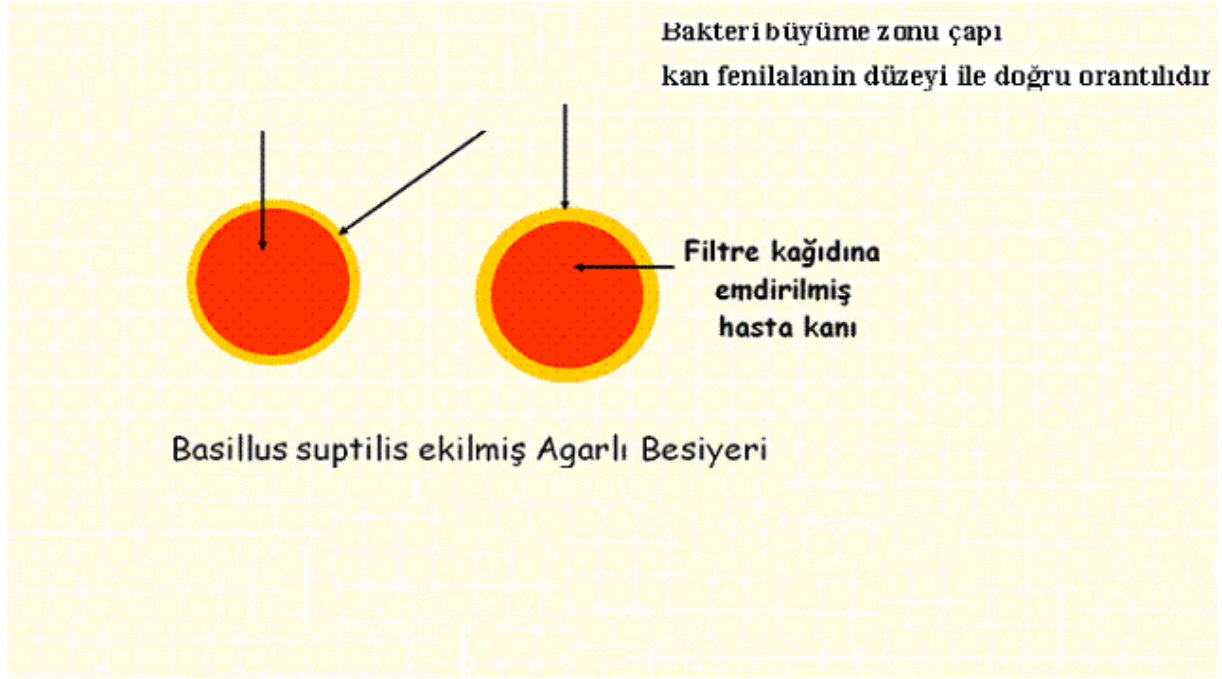
2.1.7.1. İdrar tarama testi (Ferrik klorür testi)

İdrarda fenilpirüvik asit arama esasına dayanır. Test için idrarın taze olması ve pH'ının 2-3 olması önemlidir. Testten önce bebekler en azından 24 saat süre ile süt ile beslenmelidirler; çünkü proteinden fakir diyetle beslenen bebeklerde fenilketonüri gizli kalabilir. Test, 5 mL idrar üzerine %5-10'luk FeCl₃ çözeltisi damlatılarak yapılır. Yeşil renk oluşması, idrarda 40-50 µg/mL fenilpirüvat olduğunu gösterir.

2.1.7.2. Kan tarama testi (Guthrie testi)

Serumda artmış fenilalanin düzeyini saptamak için yaygın olarak kullanılır. Test *Bacillus subtilis* için kültür ortamında (*Bacillus subtilis* adlı mikroorganizmanın emdirildiği disk şeklindeki filtre kağıdında) fenilalanin yetmezliği oluşturulduktan sonra yüksek düzeyde fenilalanin içeren kan örneğinin eklenmesiyle anlamlı düzeyde bakteri gelişiminin gözlenmesi esasına dayanır (Şekil 2).

1965 yılında Amerika'da New York'da Dr. Robert Guthrie çok sayıda yeni doğan etkin taranmasına elverişli tarama testini geliştirmiştir. Sonrasında tüm yenidoğanlara Guthrie testi ile tarama zorunlu hale getirilmiş ülkemizde ise ilk olarak 1983 yılında Ankara'da bir çalışmada fenilketonürinin sıklığının yüksek olduğu saptanmış 1986 yılında Sağlık Bakanlığı'nın organizasyonu ile ilk olarak 36, ardından bütün illeri kapsayacak bir yenidoğan tarama programı başlanmıştır.



Şekil 2.: Yenidoğandan tarama amaçlı Guthrie kağıdına kan alımı

Örnek alınırken miktarının yetersiz olması, kanın filtre kağıdına yeterince emdirilmemiş olması, kan örneği alınan filtre kağıdındaki bölgede yırtıklar olması, kan örneğinin yeterince kurutulmadan zarfa konması, filtre kağıdının kapiller tüp ya da enjektöre alınan kan ile doldurulması da tarama amaçlı kanın test için uygun olmamasına neden olacaktır.

Miadında doğmuş, sağlıklı bir yenidoğandan en uygun kan alım zamanı doğumdan sonra 48-72 saattir. Amaç anne sütü ya da mama ile beslenen bebeğin kan fenilalanin düzeyinin yükselmesi için bebeğe gerekli süreyi tanımaktır. Eğer yenidoğana diyaliz ya da transfüzyon uygulanması gerekiyorsa, hastanın durumu elveriyorsa bu işlem yapılmadan önce kan örneği alınmalıdır. Eğer diyaliz ya da transfüzyon uygulanmadan önce örnek alınamamışsa, ilgili hekim, plazma ya da eritrositler bebeğin kendi metabolik durumunu tekrar yansıtabileceği dönemde örneğin tekrar alınmasını sağlamalıdır (Son transfüzyondan 24 saat sonra ve 6. günde).

Yenidoğan tarama sonucu pozitif çıkan, ileri değerlendirilmesi gereken vakalarda plazma fenilalanin ve tirozin düzeyleri kantitatif olarak belirlenir ve sekonder HFA nedenleri açısından ayırıcı tanı yapılır. Klasik FKÜ dışında primer HFA düşünülen vakalara biyopterin metabolizma bozukluğu ayırıcı tanısı için BH₄ yükleme testi uygulanır.

Teknolojik ilerlemelere paralel olarak yeni tarama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin duyarlılık ve özgünlüğü Tablo.5'te belirtilmiştir.

Tablo 5. Fenilketonüri taramasında kullanılan yöntemler

Test	Duyarlılık	Özgünlük	Tarama kapsama	Testin karmaşıklığı
Guthrie	Orta	Orta	Düşük	Düşük
Florometrik	Yüksek	Yüksek	Düşük	Orta
Enzimatik	Orta	Yüksek	Düşük	Orta
HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi)	Yüksek	Yüksek	Orta	Yüksek
Kağıt veya ince tabaka kromatografisi	Düşük	Orta	Orta	Düşük
Ardışık kütle spektrometrisi	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek

2.1.7.3. Fenilketonürinin Prenatal Tanısı

Klasik fenilketonüri, fenilalanin hidroksilaz enzimini kodlayan gendeki 40 ya da daha çok mutasyonun neden olduğu bir hastalık grubudur(21). Linsky ve arkadaşları ilk kez 1984'te FAH lokusunu 12. kromozomda ve 12q distal parçasında göstermişlerdir. (22). FAH geni 13 ekzon içerir, 90 kb'dır ve 2.5 kb'lık mRNA'yı kodlar (23,24). FAH geninin normal ürünü 452 amino asit içeren FAH proteindir (25).

Herhangi bir mutasyonla ilgili sıklık toplumlar arasında farklıdır. Hastalık sıklıkla çift heterozigottur. Yani fenilalanin hidroksilaz geni her alelde farklı mutasyona sahiptir. Bu karışıklığa rağmen birçok toplumda vakaların çoğu az sayıda (6-10) mutasyon sonucunda oluşmaktadır.

2.1.8. Fenilketonüri Tedavisi

Klasik Fenilketonüride tedavinin amacı beyin hasarını önlemek veya en aza indirmek için vücut sıvılarında fenilalanin ve metabolitlerini azaltmaktır. Bu diyetten fenilalaninin kısıtlanması ile sağlanabilir. Kan fenilalanin düzeyi 3-15 mg/dl arasında olacak şekilde diyet ayarlanır. Yeterli kalori ve vitamin sağlanmalıdır. Tirozin de esansiyel bir aminoasit olduğu için hastanın diyetinde yeterli miktarda bulunmalıdır. 6 yaşından sonra diyet biraz gevşetilebilir.

Fenilketonüri annenin hamileliğinde diyet uygulanmaz ise abortus riski artar. Fetusta mikrosefali, kalp anomalisi görülür. Diyete konsepsiyondan önce başlanır. Hamilelik boyunca kan fenilalaninin 10 mg/dl'yi geçmemesine çalışılır. Hafif "Mild" Hiperfenilalaninemide hastalara kontrol altında serbest diyet tedavisi uygulanmaktadır.

Kofaktör Tetrahidrobiopterin (BH₄) eksikliğine bağlı hiperfenilalaninemi tedavisinde, fenilalanin kan düzeylerinin diyetle kontrolünün genel olarak hiçbir yararı yoktur. Diyet tedavisine rağmen nörolojik bulgular ilerler. Metabolik yoldaki bloktan sonra yer alan nörotransmitter öncülleri ile, yani 5-hidroksitriptofan ve dihidroksifenilalanin (DOPA) ile replasman tedavisi kısmen yararlı olabilir. BH₄, 20-40 mg/kg/gün oral verilir.

Fenilketonüri ve Hiperfenilalaninemili hastalarda günümüzde uygulanan tedavi, fenilalanin alımının kısıtlanmasını sağlayan yarı sentetik özel bir diyettir. Diyet ile bireylerde fenilalanin alımını kısıtlanmakta ve böylece mental bozukluklar önlenmektedir. Ancak yaş ilerledikçe bu tedavinin uygulanması güçleşmektedir. Özellikle adolesan döneminde birçok hasta diyet tedavisine dikkat etmemektedir. Bu uygulama güçlükleri nedeniyle araştırmacılar diyet tedavisine alternatif olarak gen tedavisi veya enzim replasman tedavisi gibi tedavi modellerini geliştirmeye çalışmaktadırlar.(26).

2.2. Prolidaz

2.2.1. Prolidazın Tanımı

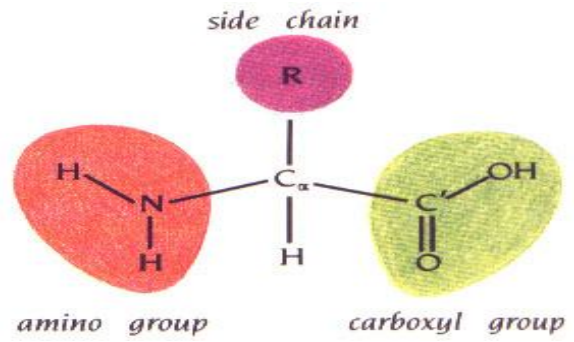
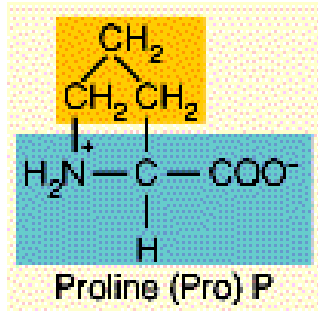
Bergmann ve Fruton 1937 yılında bilinen dipeptidazlardan farklı olarak glisin- prolini hidrolize eden bir enzimi tanımlamışlardır. Bu enzim prolidaz olarak adlandırılmış ve birçok hayvan dokusunda varlığı gösterilmiştir (28). Enzim yaklaşık 70 yıl önce bulunmasına rağmen önemi 35 yıl önce eksikliği çalışmaları yapıldığında anlaşılmıştır (28).

Prolidaz hidrolazlar sınıfına ait, Mn^{+2} ile aktive olan bir metalloenzimdir (29,30). Uluslar arası sınıflandırmaya göre; EC 3.4.13.9 sınıfında yer alır. Hidrolazlar çeşitli bağların hidrolizini kataliz ederler. Bu bağlar; C-O, C-N, C-C ve fosforik anhidrit bağını da içeren bazı bazlardır. Prolidaz enzimi karboksil terminal pozisyondaki prolin veya hidroksprolin içeren dipeptitlerin hidrolizini katalizler

2.2.2. Prolinin Yapısal Özellikleri ve Önemi

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

Prolinin diğer amino asitlerden farkı R grubunun hem amino grubu hem de α karbon grubuna bağlı olarak siklik bir yapıya yol açmasıdır (Şekil-3).



Şekil 3. Prolin ve diğer bir aminoasidin yapısal görünümü

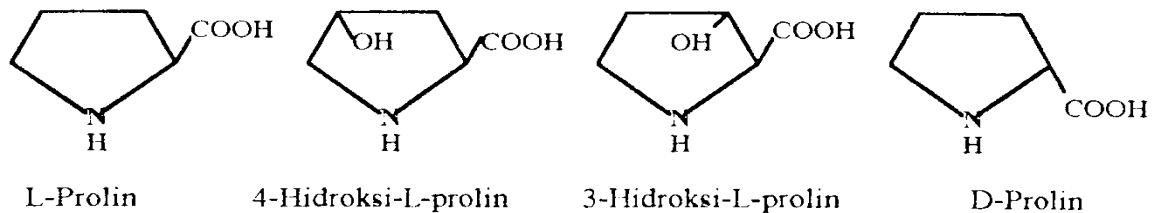
Benzersiz yapısal özellikten dolayı prolin bir peptit sekansına girdiği zaman önemli konformasyonel özellikler gösterir. Bu aminoasidin siklik yapısı polipeptit omurganın yapısal yönlerine temel sınırlamalar getirmektedir. Prolin siklik yapısının sonucu olarak hiçbir fonksiyonel grup içermez ki bu durumda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

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

Prolin ve hidroksiprolin, kollajen yapısında yer alan en önemli amino asitlerdir. Prolin türevleri olan 3-hidroksiprolin ve 4-hidroksiprolin karışık fonksiyonlu oksijenazlar kullanılarak polipeptit zincirinde bulunan prolin kalıntılarından elde edilmektedir (Şekil 4). Hidroksiprolinin hidroksiprolin oksidaz ile parçalanması sonucunda gliksalat ve pirüvat oluşmaktadır.

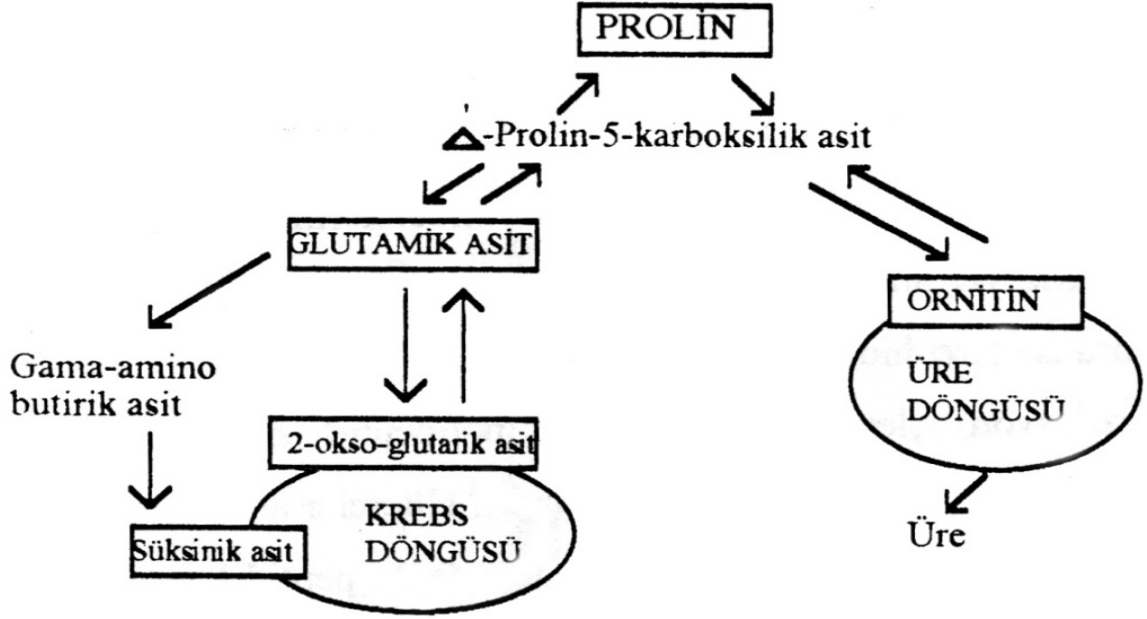
Prolin, biyolojik olarak aktif peptitlerin enzimatik degradasyonuna karşı korunmasını sağlamaktadır. Bu durum peptit veya protein prekürsörlerinin post-translasyonel modifikasyonlarının regülasyonunda açıkça bellidir. Polipeptit zincirinin içinde yerleşik olan prolin amino asitleri, zincirlerin enzimatik süreci öncesinde modifikasyon bölümünde bulunur ve polipeptit zincirinin hassasiyetini proteolizle sınırlayan yapısal unsurlar olarak hareket eder. Bu durum peptitlerin post-translasyonel modifikasyonunda görev alan ekzopeptidazların özelliği ile ilişkili araştırmalarda gösterilmiştir. Pekçok biyolojik olarak aktif peptitlerin amino ucuna yakın yerlerde ortaya çıkan prolin gözlemiyle desteklenmektedir .

Prolin ve hidroksprolin prolidino halkasındaki azot atomuna bir hidrojen atomunun girmesi ile oluşmaktadır. Bunlar genelde imino asit ismiyle adlandırılır. L-prolin amino asitlerin hücre dışı havuzunun temel bileşenidir. Bunu sadece glutamin ve alanin amino asitleri takip eder. Hidroksprolin öncelikle vücut sıvılarında oligopeptitlerde bulunmaktadır. İnsanlarda hidroksprolinin yapısı 4-hidroksi –L-prolin şeklindedir ve vücut sıvılarında daha az bulunur (Şekil 4). Protein yapısında bulunan hidroksprolin peptide bağlı prolinin hidrokssillenmesi ile oluşmaktadır (31).



Şekil-4: Memeli kollajeninde bulunan prolin ve hidroksprolin izomerleri

Prolin ayrıca Krebs ve üre döngüleriyle metabolik olarak bağlantılıdır. Δ -prolin-5-karboksilik asit prolin metabolizmasında iki döngüyü birbirine bağlayan bir pozisyonadır (Şekil 5). Prolinin karbon zincirinden Krebs döngüsüne geçişi, tüm dokularda bilinen klasik yoldan 2-oksaglutarik asit metabolizması ile olur (32).



Şekil-5. Prolinin metabolik yollarla bağlantısı (Scriver 1978)

2.2.3. Prolidazın Yapısı

Prolidaz enzimi birçok memeli dokusunda ve mikroorganizmalarda dağılım gösterir. Doğal, sitoplazmik, homodimerik bir metalloenzimdir. Mn^{+2} prolidaz enzimi aktivitesini 5-10 kat arttırmaktadır. Mn^{+2} 'a ek olarak enzimin maksimum aktivitesi için aktif merkezinde arjinin ve anyonik amino asit artıklarının olması gerekir (31).

Proteazlar hep monomer yapıda olmasına rağmen tüm prolidazlar dimer yapı gösterirler ve ancak bu şekilde katalitik aktivite gösterirler (33). Prolidaz glikoprotein yapısındadır ve ağırlık olarak %5 karbonhidrat içermektedir. Prolidazın saptanan sekonder yapısında α -heliks (%33), β -tabakalı (%41) ve 30 potansiyel beta bağlantı bölgelerine eşit bir şekilde dağılmış hidrofobik ve hidrofilik alanlar bulunmaktadır. Enzimin primer sırası bilinen proteinlere benzemez fakat bazı sıraları (%29'dan fazlası) F_1 -ATP az'ın α ve β subünitelerinin sırasına benzerlik göstermektedir (31,34).

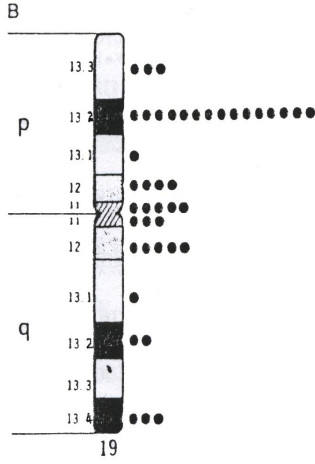
Prolidaz enziminin aktif merkezinde tiyol grubu yer alır ve bu grup bloke edilirse aktivite düşer. Bu da sisteinin enzimin aktivitesi için gerekli olduğunu gösterir. Doğal enzim için optimum pH: 7.6-7.8'dir ve izoelektirik nokta pH:4.4-4.5 olarak saptanmış olup bu değer yapıdaki asidik amino asitlerin varlığını belirtmektedir (31)Enzimin karakteristiği araştırıldığında DEAE (Dietilaminitil) selüloz dizi kromatografisinde prolidazın iki pik verdiği görülür (33).

Bai Hu 1992 yılında yapmış olduğu çalışmada prolidazda her monomer için iki aktif bölgenin olduğunu saptamış ve enzimin duruma bağlı olarak bu iki aktif bölgenin substrat spesifikliğı ve Mn^{+2} ile preinkübasyon ortamındaki aktivasyon bakımından da farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur (33).

2.2.4. İnsan Prolidazının Primer Yapısı ve Gen Lokalizasyonu

Prolidaz geni sembolü PEPD'dir ve insanda 19 numaralı kromozomun kısa kolunda lokalizedir (19p 13,2 bölgesi). İnsan cDNA 'sı 1482 baz çiftinin okunmasıyla oluşur bu da 493 amino aside karşılık gelmektedir (34). Enzimin komplementer DNA klonları insan karaciğeri ve prenatal cDNA bankalarında izole edilmiştir.

Prolidazın nükleotit sırası saptanmıştır. Enzim amino asit olarak X-Ala-Ala-Ala sırası ile başlamaktadır (35) Prolidaz geni (PEPD) polimorfik allelleri içerir, bu aktiviteyi engellemez ve nadir allelleri prolidaz eksikliğine neden olmaktadır (31). Amino asit sırasının saptanması ve gen lokalizasyonu, enzimin eksikliğinin sebep olduğu kalıtsal hastalığın temelini anlaşılması bakımından önemlidir. Prolidazın genomik sırası oldukça geniştir. En az 130 kb ve 15 ekson içermektedir. Ekson intron bağlantılarındaki tüm konformasyonlar GT/AG kuralına uymaktadır (Şekil 6). Kodlama sırası genomik sıranın % 2 'sinden oluşur.



Şekil 6. Prolidaz genini içeren kromozom 19 (Endo ve Taloue 1989)

2.2.5. Prolidazın İzoenzimleri

Dietilaminoetil selüloz dizi kromatografisi (DEAE) ile deri fibroblast kültürüleri ve normal insan eritrositlerinden ayrıştırılan prolidazın 2 formunun olduğu görülmüştür (36). Bunlar prolidaz I ve prolidaz II olarak isimlendirilmiştir. Bu iki izoenzim substrat spesifitesi ile bazı kimyasal özellikler bakımından farklılıklar gösterirler (37). Bu iki izoenzimi ilk izole eden Butterworth ve Priestman olmuştur (1985). Sonra Myara ve arkadaşları 1987 ve 1989 yılında (38,39). Ohhashi ve arkadaşları ise 1990 yılında izoenzimleri izole etmeyi başarmışlardır.

İzoenzimlerin molekül ağırlıkları saptanmış ve prolidaz I'in molekül ağırlığının 112 kDa olduğu ve birbirini tamamlayan eşit molekül ağırlığında 2 subüniteden oluştuğu (56kDa) bulunmuştur (37). Prolidaz II 'nin ise molekül ağırlığının 185 kDa olduğu ve birbirine eş iki subüniteden (95 kDa) oluştuğu gözlenmiştir (40,41).

Prolidaz I tüm insan dokularında bulunur. Yapılan çalışmalarda prolidaz I 'in tüm iminodipeptitlerle reaksiyona girmesine rağmen gly-pro dipeptitini tercih ettiği bulunmuştur. Cosson ve arkadaşları 1992 'de prolidaz II nin gly-pro dipeptidine karşı düşük bir aktivite gösterdiğini ve bu izoenzimin plazmada bulunmadığını kaydederek preinkübasyonun uzaması ile aktivitenin önemli ölçüde düştüğünü göstermişlerdir. Prolidaz II'nin en yüksek aktiviteyi gly-pro yerine met-pro 'ya karşı gösterdiği saptanmıştır (37).

Prolidaz I'i in vitro tespit etmek için optimum şartlar; 1Mm MnCl₂ konsantrasyonunda 24 saat 37°C'de preinkübasyon olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Mn⁺² konsantrasyonunun yükseltilecek zamanın azaltılabileceğini ya da yüksek preinkübasyon ısısı, düşük MnCl₂ konsantrasyonu ve düşük preinkübasyon zamanı kullanılabileceği kaydedilmiştir (42). Cosson ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda prolidaz I ve prolidaz II'yi kromatografik olarak ayırdıktan sonra izoenzimlerin farklı doku dağılımları gösterdiklerini bulmuşlardır (Tablo 6) (43).

Tablo-6. Prolidaz I ve II izoenzimlerinin doku dağılımları (%) (Cosmos ve Myara 1992)

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

Araştırmacılar karaciğer kaynaklı prolidaz II'nin karaciğerde inhibe edildiğini saptamışlardır. Bu inhibisyona ise plazma proteinlerinin sebep olduğunu belirtmişlerdir. Haptoglobulin, α_2 makroglobulin ve α_1 antitripsinin prolidaz II'nin aktivitesinde etkili olmadığı, fakat saf albuminin altı saatlik inkübasyondan sonra aktiviteyi ortadan kaldırdığı görülmüştür. Albuminin bu inhibitör etkisine dayanarak insan plazmasında prolidaz II'nin aktivitesinin olmadığı açıklanmıştır (43).

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

Çeşitli insan dokularından alınan prolidaz I izoenzimi tavşan immunglobulinleri ile çapraz reaksiyon verir fakat aynı immunglobulinler prolidaz II ile reaksiyon vermez. Bu durum hepatik fibrozis ve prolidaz eksikliği olan hastaların dokuları ve plazmalarından prolidaz I araştırmalarında bir spesifik immünoassay yöntem geliştirilebileceğini akla getirmiştir (42).

2.2.6. Prolidaz İnhibitörleri ve Aktivatörleri

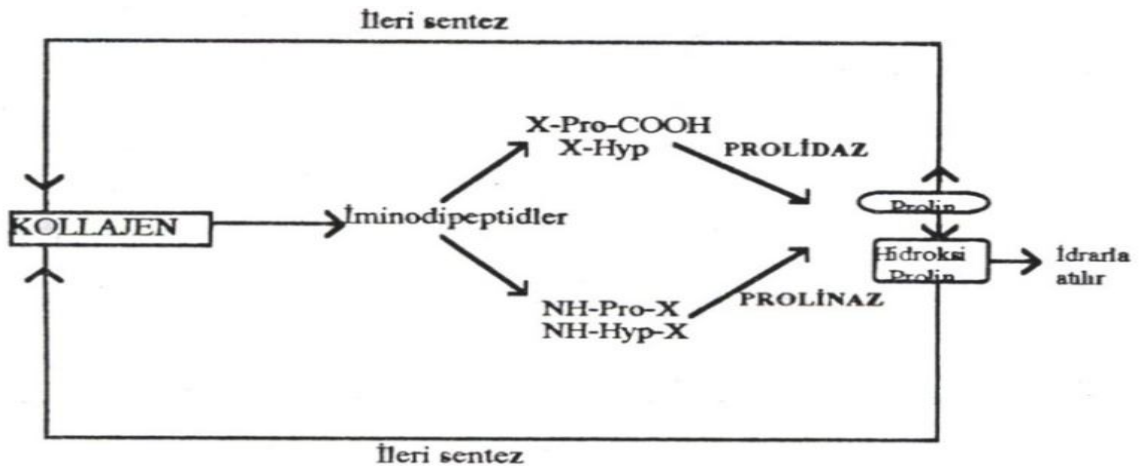
Yapılan çalışmalarda enzimin aktivasyonu için gerekli olan Mn^{+2} iyonu yerine başka metal iyonlarının ilavesi ile inhibisyon olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalar domuz böbrek prolidazı üzerinde 1957 yılında yapılmıştır. Fe^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Ag^{+1} , Hg^{+2} , Pb^{+2} ve Pt^{+4} iyonlarının prolidazı inhibe ettiği bulunmuştur. Ortalama 0,001-0,0004 M aralığındaki konsantrasyonlarda glutasyon kullanıldığında optimal stabilizasyon ve aktivite sağlandığı ancak glutasyonun yüksek konsantrasyonunun inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur. Aynı araştırmacılar iyodoasetamin ve p-kloromerküri benzoatın da enzimi inhibe ettiğine değinmişlerdir (44).

Prolidazın substrat analogu olan asetilprolin ve trans-1,2 sikloptadikarboksilikasit tarafından kompetatif inhibisyonunda K_1 'in pH 'ya bağlı olarak izledikleri yolu araştırdıklarında enzimin fonksiyonel grubu ile substratın pKa: 6,6 'da bağlandığını bununla birlikte bu maddelerin inhibisyonunun farklı yollar izlediğini görmüşlerdir (45).

2.2.7. Prolidazın Kollajen Yapım ve Yıkımında Önemi

Kollajenler, hayvansal bağ dokunun temel bileşeni olup vücutta en fazla bulunan proteinlerdir. Bağ doku iskeletinin yapısını oluşturan kollajen, inflamasyon ve yara iyileşmesinde temel rol oynar. Kollajenin aminoasit kompozisyonu %33 glisin, %20-25 prolin ve hidroksiprolin, %5-11 lizin ve hidroksilizinden oluşur. Farklı genler tarafından kodlanan en az 15 tip kollajen vardır. Tip I, II, III, V ve XI fibriller kollajen olarak isimlendirilir. Kollajenler birçok dokuda fibroblastlar tarafından sentezlenirler. Ribozomlarda preprokollajen olarak başlayan sentez sitozolde prokollajen şeklinde devam eder ve hücre dışı alanda tropokollajen ve kollajen oluşumu ile sonlanır. Kollajen molekülleri alfa zincirleri adı verilen, birbiri etrafında üçlü heliks halinde sarılarak ip benzeri yapı oluşturan üç polipeptitten meydana gelir. Polipeptit yapılarının her üç pozisyondan birinde en küçük aminoasit olan glisin bulunur. Glisin heliksin üç zincirinin bir araya geldiği kısıtlı alana sığmaktadır. Glisin kalıntıları, Gli-X-Y olarak tekrarlayan, X'in genelde prolin ve Y'nin hidroksiprolin veya hidroksilizin olduğu zincirin bir parçasıdır. Kollajen diğer bir çok proteinde bulunmayan hidroksiprolin ve hidroksilizin içerir. Hidroksiprolin kollajenin üçlü heliks yapısının dayanıklılığını sağlamada önemlidir. Kollajenin yarı ömrü 50-300 gündür. Bu ömür; gelişme, büyüme, doku yapımı ve yara iyileşmesi gibi durumlarda uzar. Kollajenlerin yıkımı genellikle nötral Ph'da aktif olan pek çok matriks metalloproteinazlarının (kollajenazlar) sinerjistik aktivitesinin bir sonucudur. Bununla birlikte jelatinaz, stromelizinler, polimorf elastaz ve katepsin gibi nonspesifik proteinazlar da bu yıkıma katılırlar. Kollajenazlar; fibroblast, kondrosit, osteoblast ve endotelial hücrelerden latent proenzim formunda salınırlar ve plazminle aktivasyonu takiben çapraz bağlı kollajeni parçalayarak dipeptitlere ayırırlar. Bu dipeptitler de prolidaz, prolinaz ve diğer dipeptidazlar tarafından serbest aminoasitlere parçalanırlar.

Prolidazın bütün biyolojik fonksiyonunun prolin döngüsüyle beraber kollajen dejenerasyon ürünleri ve diğer Xaa-Pro dipeptidlerin metabolizması olduğuna inanılmaktadır. Prolidaz, C-terminalinde amino asidi prolin veya hidroksiprolin olan dipeptidleri hücre içinde hidroliz eder. Prolin yeniden döngüye girer ve yeni protein sentezinde kullanılırken hidroksiprolin idrarla atılmaktadır (28,46) Kollajen yapısındaki amino asitlerin yaklaşık %25'ini prolin ve hidroksiprolin oluşturduğundan, prolidaz kollajen yıkımında önemli rol oynamaktadır (47) Prolidaz, hücre içi protein yıkımının son basamağında, özellikle yüksek miktarda prolin içeren prekollajenin yıkımı aşamasında rol oynamaktadır (42,43). Enzim için substrat kaynağı kollajen olup iminopeptidler kollajenin yıkımının son basamağında ortaya çıkmaktadır. Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinazın yeri aşağıdaki şekilde görülmektedir (Şekil-7).



Şekil 7. Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinazın yeri (Myara ve Myara 1984) (49)

Prolidaz, beslenme ile alınan proteinlerden ve vücuttaki depo kollajeninden imino asitlerin geri kazanılmasında önemli rol oynar (48). Prolidaz, C-ucunda prolin veya hidroksiprolinin imino azotunu içeren peptid bağı bulunduran bileşiklerin hızla hidrolizini katalizleyen tek enzim olduğu için spesifitesi yüksektir (33). Prolidaz eksikliği prolinin normal döngüsündeki bozulmayla sonuçlanır. Prolidaz eksikliğinde büyük miktarda hidroksiprolin üre ile dışarı atılır. Prolidaz enzim aktivitesi eritrosit, lökosit ve fibroblastlarda çok düşüktür. Etkilenen hasta bireylerde prolidaz enzim aktivitesi saptanamaz. İmino peptidüri, aynı zamanda raşitizm, hiperparatiroidizm ve paget hastalığı gibi durumlarda da tanımlanır. Fakat imino peptidüri prolidaz eksikliğinde çok daha yüksektir.

Prolidaz eksikliği cilt ve diğer kollajen dokularda anormalliklerle karakterize bir sendromla sonuçlanır. Bu nadir görülen genetik prolidaz eksikliği otozomal resesif olarak geçmektedir. Prolidaz geni başka bir kalıtsal rahatsızlık olan miyotonik distrofi ile ilgili olması açısından önemlidir.

Prolidaz enzimi uzun zamandan beri bilinmesine rağmen önemi, son yıllarda eksikliği ile ilgili çalışmalarla iyice anlaşılmıştır (50,51). Bu yüzden bu konuda az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğu da eritrosit prolidazı ile ilgili olup serum prolidazı hakkında çok şey bilinmemektedir. Prolidaz enziminin genetik eksikliğinin sonucunda mental gerilik, tekrarlayan infeksiyonlar ve deri lezyonları ile karakterize bir klinik tablonun ortaya çıktığı bildirilmiştir (48,52). Prolidaz eksikliği olan kişilerde prolidaz I aktivitesinin deri fibroblast kültüründe ve kan hücrelerinde azaldığı da gösterilmiştir (53).

Fetal büyüme sırasında kollajen turnoverinin yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Dismatür bebeklerde prolidaz aktivitesi (amniyotik sıvıda) anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu nedenle prolidaz aktivitesinin fetal matürasyonun derecesini gösterdiği düşünülmektedir. Amniyon sıvısında ölçülen prolidaz aktivitesinin fetal matürasyonun ve gelişme geriliğinin bir indikatörü olarak kullanılabilmesi öne sürülmektedir. Ayrıca kollajen metabolizmasında bozuklukla seyreden silikozis hastalığının tedavisinde de prolidaz enziminin kullanılması hedeflenmektedir. Böylece hızla kollajen yıkımı ile seyreden silikozis hastalarında prolidaz enzim aktivitesinin artırılması tedavide faydalı bir yaklaşım olarak düşünülmektedir (54).

3. MATERYAL – METOD

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Santrifüj Universal 30 RF[®]

Hassas terazi Sartorius[®]

Dijital pH-metre (Hanna[®], pH 211 model Japon)

Vorteks DCA-VF-2[®]

Sıcak su banyosu Nüve BM 402[®]

Visible spektrofotometre Jasco V-530 UV/Vİ3 Spektrofotometri[®]

Derin dondurucu (-80 °C - Derin dondurucu (New Brunswick Scientifi[®], C54285)

Deiyonize su Cihazı (Barnstead[®])

Otomatik pipetler

3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

<u>Madde Adı</u>	<u>Formülü</u>	<u>Firma ve Katalog no</u>
L-Prolin	C ₅ H ₂ NO ₂	Sigma [®] P-0380
Glisil-Prolin	C ₇ H ₂ N ₂ O ₃	Sigma [®] G-3002
Magnezyum klorür	MgCl ₂ 6H ₂ O	Riedel [®] (IV) hidrat
Glasiyel asetik asit	CH ₃ COOH	Merck [®] 541
Ortofosforik asit	H ₃ PO ₄	Merck [®] 541
Trizma HCl	C ₄ H ₁₁ NO ₃ HCl	Sigma [®] T-3253
Trizma BASE	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Sigma [®] 93349
Ninhidrin	C ₉ H ₆ O ₄	Sigma [®] N4876
Manganklorür (II)hidrat	MnCl ₂ H ₂ O	Merck [®] 5917
Glutasyon	GSH	Merck [®]
Sülfürik asit	H ₂ SO ₄	Merck [®]
Sodyum klorür	NaCl	Merck [®]

O-Dianisidine dihydrochloride	$C_{14}H_{16}N_2O_2 \cdot 2HCl$	Sigma [®]
Hidroklorik asit	HCl	Merck [®]
Ferroz amonyum sülfat	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	Merck [®]
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Merck [®]
Xylenol orange	$C_{31}H_{32}N_2O_{13}S$	Sigma [®]
Glycerol	$CH_2OHCHOHCH_2OH$	Merck [®]

3.3. Örneklerin Hazırlanması

Bu çalışmamızda; yenidoğan tarama testi (Guthrie testi) şüpheli bulunduktan sonra kontrol testleriyle hastalığı kesinleşen 30 fenilketonüri hastası ile aynı yaş ve kilo ortalamasına sahip 30 sağlıklı bireyden venöz kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Elde edilen serum örnekleri çalışılncaya kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Çalışma günü serum örnekleri eritildi ve prolidaz düzeyleri çalışıldı.

3.4. Serum Prolidaz Aktivitesi Ölçüm (Optimize Chinard) Yöntemi

Substrat olarak glisil-prolin kullanılarak enzim aracılığı ile oluşan prolinin asidik ortamda ısı etkisiyle ninhidrin ile renkli bir bileşik (pembe renk) oluşturma ilkesine dayanarak serum prolidaz düzeyi ölçülür (72,74,75,89). Rengin şiddeti prolin konsantrasyonuna bağlıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülür.



Deney 3 basamaktan oluşur:

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

3.5. Prolidaz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar

1. Ön inkübasyon çözeltisi : pH:7'de 50 mmol/L Tris HCl tamponu içerisinde, 1 mmol/L GSH , 50 mmol/L MnCl₂ çözdürüldü.
2. Substrat çözeltisi: Öninkübasyon çözeltisi içerisinde 144 mmol/L glisil-prolin dipeptidi çözdürüldü. Ancak substrat çözeltisi için pH:7.8'lik Tris HCl tampon kullanıldı.
3. Tepkimeyi durdurma çözeltisi : 1 mL glasiyal asetik asit kullanıldı.
4. Ninhidrin çözeltisi (modifiye (optimize) chinard çözeltisi) : 0.5 mol/L'lik ortofosforik asit içerisinde 3 g/dL olacak şekilde ninhidrin manyetik karıştırıcı ve ısı yardımıyla 70 °C'de eritildi.
5. Prolin standardı: 5 mg L-prolin bir miktar deiyonize su içerisinde çözdürülüp son hacmi 100 mL ye tamamlandı.

İşlem

- a-) Yöntemde, 100 µL serum ile 100 µL serum fizyolojik karıştırılıp bu karışımdan 25 µL alınıp, 1 mmol/L GSH ve 50 mmol/L MnCl₂ pH 7 'de 50 mmol/L Tris HCl tampondan oluşan ön inkübasyon solüsyonundan 75 µL alınarak 37 °C' de 30 dakika inkübe edildi.
- b-) Karışımın üzerine 144 mmol/L Gly-pro içeren substrat çözeltisinden (pH 7.8) 100 µL eklenerek 37 °C' de 5 dakika inkübe edildi.
- c-) Daha sonra inkübasyonsuz (sıfır zaman) tüpleri hazırlandı. İnkübasyonlu tüplere inkübasyonun sonunda 1mL glasiyal asetik asit ilave edilerek reaksiyon durduruldu. İnkübe edilmemiş örnek bulunan sıfır zaman tüplerine de aynı hacimde glasiyal asetik asit ilave edilip reaksiyon durduruldu.
- d-) İnkübasyonlu ve inkübasyonsuz (n sıfır zaman) tüplerin üzerine 300uL Tris-HCl tamponu (pH:7.8) ve 1 mL Ninhidrin çözeltisi eklendi.

e-) Yukardaki işlemler uygulandıktan sonra tüplerin ağzı kapatılarak 90 °C' de su banyosunda 20 dakika bekletildi. Daha sonra buzlu su banyosunda soğutulup beklenmeden 515 nm'deki absorbanlar substratın katılmadığı örnek körüne karşı okutuldu. Ölçülen prolin derişimleri standart olarak kullanılan 5 mg/dL'lik L-prolin ile karşılaştırılarak hesaplandı. Prolidaz enzim aktivitesi birimi olarak, enzimin Gly-Prolin substratını parçalayarak prolin oluşturduğu basamaktaki 1 dakikada oluşan µmol/L cinsinden prolin olarak tanımlandı.

3.6. Prolidaz Aktivitesinin Hesaplanması

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

S

A: İnkübasyon tüpü absorban değeri

B: Sıfır zaman tüpü absorban değeri (inkübasyonsuz)

[S] : Standart konsantrasyonu (µmol/L)

S: Standart absorban değeri

Faktör: Dilüsyon değerleri/inkübasyon periyodu

Faktör : $\frac{\text{Preink. Ortamındaki sulandırma} \times \text{İnk. Ortamındaki sulandırma}}{\text{İnkübasyon zamanı}}$

İnkübasyon zamanı

Faktör: $\frac{8 \times 2}{5'}$

5'

Prolidaz aktivite düzeyi : $\frac{(A-B) \times [S] \times \text{Faktör}}{S}$: 1 litrede 1 dakikada oluşan

S

µmol prolin miktarı

4-BULGULAR

Çalışmamıza katılan hasta ve kontrol gruplarının demografik ve karakteristik bilgileri ve bunların karşılaştırılması Tablo 7’de özetlenmiştir.

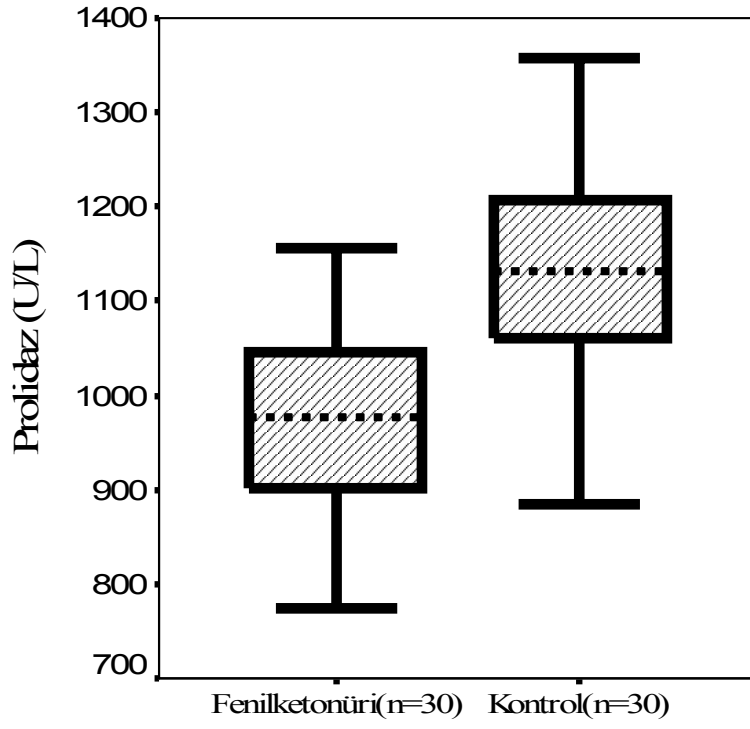
FKÜ’li hasta grubunda serum prolidaz enzim aktivite düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulundu ($p<0,001$) (Tablo 8). Hasta ve kontrol gruplarının serum prolidaz enzim düzeylerinin karşılaştırılması Şekil 8’de boxplot’la da gösterildi.

	Kontrol (n= 30) Ortalama ± S.D	FKU (n=30) Ortalama ± S.D	P Değeri
Cinsiyet (E/K)	15/15	17/13	>0,05
Yaş (Yıl)	6,06 ± 2,03	5,90 ± 1,63	>0,05
Boy (cm)	106,23 ± 32,18	99,26 ± 25,55	>0,05
Kilo (Yıl)	16,16 ± 5,12	16,33 ± 5,69	>0,05
BMI (Kg/m ²)	16,80 ± 5,34	14,92 ± 4,55	>0,05

Tablo7. Fenilketonüri hastaları ve Kontrol gruplarının demografik ve karakteristik bilgilerinin karşılaştırılması

Tablo 8. Fenilketonüri hastaları ve Kontrol grubunun Prolidaz enzim aktiviteleri

	Kontrol (n= 30) Ortalama ± S.D	FKU (n=30) Ortalama ± S.D	P Değeri
Prolidaz (U/L)	1128,28 ± 123,99	971,93 ± 104,34	<0,001



Şekil 8: Hasta ve kontrol grupları arasında serum prolydaz aktivitelerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Akraba evliliklerinin % 21.21 gibi yüksek değerlerde olduğu ülkemizde fenilketonüri gibi dramatik sonuçlar doğuran, otozomal resesif kalıtım yoluyla kalıtılan hastalıklar önemli bir sorun teşkil eder. Fenilketonüri Türk popülasyonunda görülme oranı en yüksek ve diyet tedavisi ile önlenebilen önemli tek gen hastalıklarından birisidir. Fenilketonüri hastalığı, fenilalanin amino asidinin (FA) tirozine dönüşümünü sağlayan fenilalanin hidroksilaz enziminde (FAH) veya bu enzimin kofaktörü olan tetrahidrobiopterinin (BH₄) sentez ve rejenerasyonundan sorunlu olan diğer enzimlerdeki bozukluğa bağlı olarak ortaya çıkan heterojen hastalık grubudur. FKÜ'nün ülkemizdeki sıklığı konusundaki yayınlar arasında farklılıklar olmakla birlikte ortalama 1/4500 olduğu bildirilmiştir FKÜ tanısı klasik tanı teknikleri ile ancak doğum sonrasında teşhis edilebilirken, başdöndürücü bir hızla gelişen moleküler tanı teknikleri ile bugün prenatal tanı ve taşıyıcı tesbiti yapılabilmektedir. FKÜ hastaları hayatlarının erken dönemlerinde teşhis edildikleri takdirde, fenilalaninden kısıtlı bir diyet uygulaması ile oluşabilecek beyin hasarı önlenebileceğinden, tarama ve prenatal tanı teknikleri çok büyük önem arz etmektedir.

Günümüzde FKÜ en ayrıntılı çalışılmış doğumsal metabolik hastalık olup, kan fenilalanin düzeyleri ile takip edilebildiği gibi enzimatik tanısı, genetik danışma için prenatal tanısı yapılabilen ve basit bir mikrobiyolojik kompetitif inhibisyon testi olan Guthrie testi ile yenidoğan taramaları yapılabilen bir hastalık durumuna gelmiştir.

Kollajenler hayvansal dokuların ana bileşiği olup, vücutta en fazla bulunan proteindir (56). Diğer birçok dokuda olduğu gibi, karaciğerde de fibroblastlar tarafından sentezlenirler. Hepatositler ve presinüzoidal hücrelerin de kollajen oluşuna katıldığı düşünülmektedir (57). Kollajen, bağ doku iskeletinin temelini sağlar. Birçok hücre bir kollajen matriksin içinde bulunur. Hücre, kollajen ilişkisi; inflamasyon, hücre hareketi, yara iyileşmesi, trofoblast implantasyonu ve fetal gelişim için temeldir. Kollajenin aminoasid kompozisyonu, %33 glisin, %20-25 prolin ve hidroksiprolin, %5-11 lizin ve hidroksilizinden oluşur. Ayrı genlerden oluşturulan en az 24α zincirinden oluşan, 15 tane kollajen vardır. Tip 1,2,3,5 ve 11 fibriler kollajen olarak isimlendirilir. Yetişkinlerdeki kollajenin %85-90'ı tip 1, %8-11'i tip 3, %2-4'ü tip 5 içerir (57). Kollajen sadece pek çok organ ve dokunun değil aynı zamanda ekstrasellüler matriksin de yapısal bir bileşeni olması nedeniyle birçok organ, doku ve hücre patolojisinden de etkilenmektedir. Ayrıca damarların duvarlarında özellikle media tabakasında, farklı tip damarlarda oranları değişmek üzere, kollajen fibriller bulunmaktadır.

Kollajenin metabolik döngüsünde prolidaz spesifik bir enzim olduğu için önemi büyüktür (58). Kollajenin yıkımında ve prolinin kollajen yapımı döngüsüne yeniden katılımında prolidaz aktif görev almaktadır. Kollajen art arda birkaç reaksiyonla iminodipeptidlere ve bunlar da serbest aminoasitlere ayrılır. Bu aminoasitler genel sistemik aminoasit havuzuna katılmadan tekrar kollajen yapımına girer. Prolin ve hidroksiprolinin her biri kollajendeki amino asitlerin % 10'unu oluşturur. Fakat hidroksiprolin kollajen sentezine katılmadığından ve polipeptid zincirinin posttranslasyonel modifikasyonu sonucu prolinin hidroksillenmesiyle ortaya çıktığından dolayı kollajendeki amino asitlerin % 20 kadarını prolinin oluşturduğu kabul edilir (59). Kollajen yıkımının son basamağı prolidaz aracılığı ile olmaktadır. Prolidaz kollajen sentezi ve hücre gelişiminde rol alan prolinin dönüşümünde önemli rol almaktadır. Prolidaz beslenme ile alınan proteinlerden ve vücuttaki depo kollajeninden imino asitlerin geri kazanılmasında önemli rol oynar. Prolidaz enzimi (EC 3.4.13.9) -C ucunda protein katabolizmasında son basamakta oluşan prolin veya hidroksiprolinin imino azotunu içeren peptid bağı bulunduran bileşiklerin (X-Prolin veya X-Hidroksiprolin) hızlı hidrolizini katalizleyen tek enzim olduğu için spesifitesi yüksektir (89,105). Bu enzimin aktivitesinin eksikliği durumu, oldukça nadir karşılaşılan otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalığa yol açmaktadır (60).

Prolidaz eksikliği prolinin normal döngüsündeki bozulmayla sonuçlanır. Prolidaz eksikliğinde büyük miktarda prolin ve hidroksiprolin üre ile dışarı atılır. İmino peptidler gibi aminoasitleri bağlar ve sonuç olarak toplam prolin eksikliği oluşur. Prolidaz enzim aktivitesi eritrosit, lökosit ve fibroblastlarda çok düşüktür. Etkilenen hasta bireylerde prolidaz enzim aktivitesi saptanamaz. İmino peptidüri aynı zamanda raşitizm, hiperparatiroidizm ve paget hastalığı gibi durumlarda tanımlanır. Fakat İmino peptidüri prolidaz eksikliğinde çok daha yüksektir. Prolidaz eksikliği cilt ve diğer kollajen dokulardaki anormallik sendromuyla sonuçlanır. Etkilenen bölümler idrara aşırı miktarda imino peptid salgırlar ve bu peptidler prolidaz için substrat olarak görev yaparlar (50,59). Prolidaz eksikliği kronik deri ülseri, tekrarlanan enfeksiyonlar, mental retardasyon, splenomegali, karakteristik bir yüz görünümü (örneğin zayıf saçlar, yassı burun, düz alın, kalın dudaklar, hipertelarizm) gibi çeşitli klinik bulgularla bağlantılıdır

Prolidaz enzimi ile açığa çıkan prolin ve hidroksiprolin amino asitleri, kollajen dokusunun yaklaşık % 25'ini oluşturmakta ve bağ dokusunun devamlılığının sağlanması için ise gereklidirler (70). Prolidaz enzimi; intestinal mukoza (62), böbrek (63), karaciğer (64, 61), beyin (65,66), kalp (67), uterus (67), timus (68), eritrositler (69), lökositler (52,70), fibroblastlar (71) ve plazma (72,73) gibi pekçok dokuda bulunmaktadır. Geniş doku dağılımı olması prolidaz enzim aktivitesindeki değişimlerin pekçok hastalığın gelişiminde ve sonucunda önem kazanabileceğini düşündürmektedir. Fakat FKÜ hastalığında etkilenip etkilenmediğine dair herhangi bir literatur bulunmamaktadır.

Prolidaz enzim aktivitesi ölçümü yöntemi için en sık olarak Chinard tarafından tanımlanan ninhidrin tepkimesi kullanılmaktadır (74). Bu tepkime daha sonradan Myara ve ark. tarafından bazı değişiklikler yapılarak modifiye edilmiştir (72). Bu yöntemde $MnCl_2$ ile 24 saat ön inkübasyon yapıp aktive edilen enzim, Gly-Pro substratı ile ($K_m = 2.9 \text{ mM}$) 30 dakika inkübe edilip, açığa çıkan prolin miktarı ölçülerek enzim aktivitesi hesaplanmaktadır. Bu metotta daha sonra Ömer Özcan ve ark. tarafından optimize edilmiştir.(55). Prolidaz enzimi aktivitesi ölçümlerinde gözden kaçan, ortamda var olan ve substratın parçalanması ile de açığa çıkan prolin amino asidinin enzimi inhibe etme riskinin varlığıdır. Çünkü prolinin prolidaz enzimini serumda fizyolojik olarak bulunduğu konsantrasyonlarda güçlü bir şekilde inhibe ettiği kanıtlanmıştır. Bu nedenle biz de bu çalışmamızda bu optimize metotla çalıştık. Elde ettiğimiz bulgular prolidaz enzim aktivitesinin FKÜ'li hastalarda kontrollerine göre oldukça düşük olduğunu gösterdi.

Prolidaz kollajen yapısındaki prolinin glisil ile yaptığı peptid bağını yıkan tek enzim olmasından dolayı prolidaz aktivitesinin kollajen turnover hızı ile direkt olarak ilişkili olmasını bekleriz (62). Bu nedenle çalışma sonucumuza göre FKÜ'li hastalarda kollajen proteininin oldukça etkilenmiş olduğunu ve turnoverinin yavaşlamış olduğunu söyleyebiliriz. İyidoğan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada serum prolidaz aktivitesinin klinik laboratuvarlarda kemik yapım ve yıkımının bir göstergesi olabileceğini tespit etmişlerdir (76). Aksoy ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada diyabetiklerde serum prolidaz aktivitesinin oldukça düşük olduğu saptanmıştır (77). Çelik ve arkadaşları siroz hastalarında serum prolidaz seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunduğu ve kollajen turnoverinin insan karaciğerinde sirozun gelişimiyle değiştiğini ve prolidaz aktivitesinin bu dejeneratif karaciğer hastalığında kollajen metabolizmasının bozukluklarını yansıtabileceğini ortaya koydular (78).

FKÜ'li hastalarda ilk olarak incelediğimiz prolidaz enzim aktivite düzeylerinin kontrollerinden oldukça farklı olması da bu enzimin aktivitesinin FKÜ gibi önemli bir metabolik hastalıkta kollajen metabolizmasının bozulup bozulmadığını anlamamıza ışık tutacaktır. Söner ve arkadaşları kronik etanol ve selenyum verilen sıçanların karaciğerlerinde prolidaz I aktivitesinin kontrollere oranla artmış olarak bulmuştur (79). Arata ve arkadaşları ile Powel ve arkadaşları prolidaz enziminin genetik eksikliğinin sonucunda mental gerilik, tekrarlayan infeksiyonlar ve deri lezyonları ile karakterize bir klinik tablonun ortaya çıktığını bildirmiştir (80). Butterworth ve arkadaşları prolidaz eksikliği olan kişilerde prolidaz I aktivitesinin deri fibroblast kültürlerinde ve kan hücrelerinde azaldığı gösterilmiştir (57).

Gürdöl ve arkadaşları ile Hui ve arkadaşları prolidaz aktivitesinin birçok dokuda ve amniotik sıvıda bulunduğunu belirlemiştir (65,54). Zuyderhoultf ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kemik hastalıklarında hiçbir zaman yüksek prolidaz değerine rastlanmadığını belirtmiştir (81). Oono ve arkadaşları kronik yara iyileşmesinde prolidaz enzim değerininin yaradan alınan sıvı örneklerinde ve blister oluşan hastalıklarda blister içi sıvı örneklerinde arttığını bildirmişlerdir (82). Yıldız ve arkadaşları kronik yaralarda uygulanan hiperbarik oksijen tedavisinde (HBO₂) ise serum ve doku örneklerinde, prolidaz enzim değerleri ölçüldüğünde tedavi sonrasında, tedavi öncesine göre azalma gözlenmiştir (83). Camhson ve arkadaşları prolidaz eksikliği olan hastalarda immunodipeptidüri olduğunu göstermiştir. Chamson ve grubu prolidaz eksikliğinde en önemli değişikliğin kollajen yıkımının hızla artması olduğunu saptamışlardır. Bu olayın gerçekte bağ dokusu hastalığının değil, kollajen biyosentezinin azalan prolin havuzu tarafından kısıtlanmasından kaynaklandığını düşünmektedirler (84). Myara ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda serum prolidaz aktivitesinin karaciğer sirozunda ve hasarında arttığı bildirilmiştir (85). Kronik etanol ve selenyum verilen sıçanların karaciğerlerinde prolidaz I aktivitesi kontrollere oranla artmış bulunmuştur (79). Aynı şekilde CCl₄ uygulanan sıçanların karaciğerlerinde prolidaz I aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (85). Demirbağ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sol ventriküler hipertrofidan bağımsız olarak hipertansiyon ile serum prolidaz aktivitesi arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir (86). Altındağ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada dizde osteoartriti olan hastalarda serum prolidaz aktivitesinin kontrol grubuna göre azalmış olduğu tespit edilmiştir (87). Aslan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada H.pylori (+) olgularda H.pylori (-) olgulara göre serum prolidaz aktivitesinde anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir (88).

Sonuç olarak; günümüze kadar yapılmış olan ve yukarıda pek çoğunu ifade etmiş olduğumuz çalışmalar kollajenin pekçok organ ve dokunun yapısında yaygın olarak bulunan bir protein olması münasebetiyle çeşitli hastalıkların seyri sırasında değişikliğe uğradığını göstermiştir. Serum prolidaz enzim aktivitesinde kollajen metabolizmasındaki bozuklukların tespit edilmesinde bu proteinin turnoverini gösterdiği için kullanılabileceğini yine bu literatürlerde bildirilmiştir. Bununla birlikte bugüne kadar hiçbir çalışmada FKÜ hastalığında bu enzimin aktivitesi araştırılmamıştır. Bu nedenle çalışmamız bu yönüyle literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır. Bulgularımıza göre, FKÜ hastalığında prolidaz enzim aktivitesi oldukça düşmekte ve bu da bize bu hastalarda kollajen proteininin önemli oranda etkilenmiş olduğunu, metabolizmasının bozulduğunu ve turnoverının oldukça yavaşlamış olduğunu görmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Scriver CR. Phenylketonuria-Genotypes and Phenotypes. The New England Journal of Medicine. 324: 1280-1281, 1991
2. Bařaran N, Cenani A, şaylı BS, Özkınay Ö, Artan S, Seven H, Bařaran A, Dinçer S. Consanguineous Marriages Among parents of Down Patients. Clin. Genet., 42: 13-15, 1992
3. Özalp İ, Cořkun T, Tokatlı A, Tokol S, Özgüç M, Köksal G, Erdem G, Yurdakök M. Neonatal PKU screening in Turkey: 7 years experience in a developing country. Elsevier Screening, 4: 139-147, 1995
4. Cořkun T. Amino asit metabolizması ve bozuklukları. Ankara, Alp ofset ve matbaacılık, 2003
5. Luciana Lara dos Santos, Myrian de Castro Magalhaes, Adriana de Oliveira Reis, Ana Lucia Pimenta Starling, Jose Nelio Januaria et al. Frequencies of phenylalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS 10nt11, V388M, R408W, Y414C and IVS 12nt1 in Minas Gerais, Brazil. Genet. Mol. Res. 5 (1): 16-23 , 2006
6. Luiz Carlos Santana da Silva, Tiago Santos Carvalho, Fernanda Britto da Silva, Liana Morari, Angela Aguirres Fachel et al. Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. Molecular Genetics and Metabolism 79 17-24, 2003
7. Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC: The hyperphenylalaninemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Walle D (eds). The metabolic and molecular bases of inherited disease, 7th edn. McGraw-Hill: New York, vol. 1, pp 1015-1075, 1995
8. Neyzi O, Ertuğrul T. Pediatri. Nobel Tıp Kitabevleri, 2002
9. DiLella A.G., Kwok S.C.M., et.al. Biochemistry 25: 743-749, 1986
10. Smith I. and Brenton D. P. Hyperphenylalaninemias. In: J. Fernandes, J. -M. Saudubray, G. Van den Berghe. Inborn metabolic diseases, 2nd edition, Corrected second printing, Newyork, 147-160, 1996
11. John J. Mitchell MD, Charles R Scriver MD. Phenylalanine hydroxylase deficiency. Funded by the NIH. Developed at the University of Washington, Seattle, 2004
12. Haktan A, Aydın A, Bahat H, et al. Progressive systemic scleroderma in an infant with partial phenylketonuria. J Inherit Metab Dis , 12:486, 1989

13. Stephen D. Cederbaum et al. Amino acid metabolism. In: David L. Rimoin, Michael Connor J, Reed E. Pyeritz. Emery and Rimoin's principles and practice of Medical Genetics, 3rd edition, 1867-1869, 1996
14. Okano Y, Eisensmith RC, Butler F, et al. Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N Engl J Med* , 324:1232 1991
15. Verkerk PH, Van Spronsen FJ, Smith GPA, et al. Prevalance of congenital heart disease in patients with phenylketonuria. *J Pediatr*, 119:282, 1991
16. Zeman J, Bayer M, Stepan J. Bone mineral density in patients with phenylketonuria. *Acta Paediatr* 88:1348-51, 1999
17. Perez-Duenas B, Cambra FJ, Vilaseca MA, Lambruschini N, Campistol J, Camacho JA. New approach to osteopenia in phenylketonuric patients. *Acta Paediatr* 91:899-904, 2002
18. Koch R, Blaskovics M, Wenz E, et al. Phenylalaninemia and phenylketonuria in heritable disorders of amino acid metabolism (ed. WL Nyhan). John Wiley and sons, New York; 109, 1974
19. Hommes FA. On the mechanism of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninemia. *Biochem Med Metab Biol* 46:277-287, 1991
20. Marshall G, Letcher MA. Phenylketonuria. *Health A to Z*
21. Pronina N, Giannattasio S, Lattanzio P, Lugovska R, Vevere P and Kornejeva A. The molecular basis of phenylketonuria in Latvia. *Human Mutation in Brief # 585* on line 2003
22. Özer I. Fenilketonüri örneğinde doğumsal metabolik hastalıklarda genel tedavi yaklaşımı. *Klinik Pediatri*; 3 (1): 26-30; 2004
23. Scriver CR, Kaufman S. The hyperphenylalaninemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly SW, Valle D (eds) *Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (assoc eds). The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8 ed. McGraw- Hill, New York, Ch. 77 ;2001
24. DiLella AG, Kwok SC, Ledley FD, Marvit J, Woo SL. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry*; 25:743 749; 1986
25. Hufton SE, Jennings IG, Cotton RG . Structure/function analysis of the domains required for the multimerisation of phenylalanine hydroxylase. *Biochem Biophys Acta*; 1382: 295-304; 1998
26. Woolf LI, Griffiths R., et al. Makalenin adı yok *Arch Dis Child*; 33:31- 45; 2004
27. Davis NCSmith EL: Purification and Some Properties of Prolidase of Swine Kidney, *J. Biol Chem*, 244:261-275, 1957.
28. Alparslan S, Gültepe M: Serum Prolidase Activity: Its value as an indicator of collagen accumulation in chronic liver diseases. *Biyokimya Dergisi*, 18(1):1-9, 1993

29. Milligan A , Brown G. :Prolidase deficiency: a Case Report and Literature Review. *Brit J. Dermatol*, 121:405 –409, 1989.
30. Dolenga M. Hechtman P: Prolidase deficiency in cultured human fibroblasts: Biochemical Pathology and Iminodipeptid Enhanced Growth. *Pediatr Res*. 32(4): 479-482, 1992.
31. Phang JM., Yeh GC., Scriver.: Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In the *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, (7th Ed)ScriverRC., Blandet al., Sly WS., (Eds) Mc Graw Hill, Montreal,1125-1141; 1995.
32. Scriver CR. : Disorder of proline and hydroxyproline Metabolism. In: the metabolic Basis of Inherited Disease (4th Ed.) Stanbury, J. B. Et all. 336-361. 1978
33. Mock WL, Zhuang H.: Chemical Modification Locates Guanidinly an Carbokxylate Groups Within The Active site of prolidase *Biochem biophy Res Com*.180(1): 401-406, 1991.
34. Endo F., Tanoue A.:Primary Structure and Gene Localization of Human Prolidase. *J Biol Chem*. 264: 4476-4481, 1989.
35. Endo F, Tanoue A.: Structural organization of the gene for human prolidase (Peptidase D) and Demonstration of a partial gene deletion in a patient with prolidase deficiency. *J. Biol chem*, 265(19): 11306-11311, 1989.
36. Dannenberg AL, Garrison RJ, Kannel WB. Incidence of hypertension in the Framingham Study. *Am J Public Health*, 78: 676-9;1988.
37. Cosson C, Myara I.: Only prolidase I activity is present in human plasma. *Int. J Biochem*. 24(3): 427-432, 1992
38. Myara I, Charpentier C, Lemonnier A. Optimal conditions for prolidase assay by localization of human prolidase. *J Biol Chem*, 264(8): 4476-4481.1989.
39. Myara I. Effect of long preincubation on the two forms of human erythrocyte prolidase. *Clin Chim Acta*. Dec;170(2-3): 263–270, 1987.
40. Cheng TC, DeFrank JJ, Rastogi VK, Alteromonas prolidase for organophosphorus G-agent decontamination. *Chem Biol Interact*; 119-120, 455 62, 1999.
41. Bielawska A., Bielawski K, Chrzanowski K, et al., Prolidase-activated prodrug for cancer chemotherapy cytotoxic activity of proline analogue of chlorambucil in breast cancer MCF-7 cells. *Farmaco*, 55:11-12, 736-41; 2000
42. Myara I., Cosson C., Moatti N., Lemonnier A.: Human kidney prolidase-purification, preincubation properties and immunogological reaktivity. *Int. J Biochem*. 26(2): 207-214, 1994.

43. Cosson C, Myara I.: Only prolydase I activity is present in human plasma. *Int. J Biochem.* 24(3): 427-432, 1992.
44. Boright A, Sriver CR: Prolidase Deficiency: Biochemical Classification of Alleles *Am J Hum Genet* 44: 731-740,1989
45. Mock WL., Green PC.: Mechanism and Inhibition of prolydase. *J Biol Chem*, 265 (32): 19606-19610,1990.
46. Radzicka A.,Wolfenden R.:Analogues of intermediates in the action of pig kidney prolydase. *Biochemistry.* 30: 4160-4164, 1991.
47. Myara I: Plasma prolydase activity: A possible index of collagen catabolism in chronic liver disease. *Clin Chem.* 30(2): 211-215, 1984.
48. Atara J Umemura S, Yamamoto Y, Hagiyaama M, Nohara N: Prolidase deficiency: Its dermatological manifestations and some additional biochemical studies. *Arch Dermatol* 115: 62,1979.
49. Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *J. Mayo Clin. Proc.* 63:381,1988.
50. Endo F, Matsuda I: Human erythrocyte Prolidase and prolydase deficiency. *Pediatr Res*, 16: 227-231, 1982.
51. Kodama H, Ohhashi T.: Characteristics and partial purification of prolydase and deficiency. Effect of glycyl-proline on the degradation of newly synthesized collagen *clin physiol Biochem.*7:128-136, 1989.
52. Powell GF, Rasco MA, Maniscalco RM: A prolydase deficiency in man with iminopeptiduria. *Metabolism* 23. 505 ,1974.
53. Butterworth J, Priestman DA. Presence in human cells and tissues of two prolydases and their alteration in prolydase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 8: 193,1985.
54. Gürdal F., Genç S., Yalçın Ö., Gültepe M: The presence of prolydase activity in amniotic fluid and its evaluation as a maturity test. *Biol Neonate* 67: 34 ,1995.
55. Ozcan Ö, Mustafa G, Osman Mİ: Prolidazın mutlak aktivitesini değerlendirmede fotometrik enzim aktivitesi ölçüm metodunun optimizasyonu. *Turkish Journal of Biochemistry*; 32 (1) ;12-16, 2007.
56. Oono T, Yasutomi H, Ohhahi T, Kodama H, Arata J. Characterization of fibroblast-derived prolydase; the presence of two forms of prolydase. *J Dermatol. Sci.*; 1: 319- 324; 1990
57. Butterworth J, Priestman DA. Presence in human cells and tissues of two prolydases and their alteration in prolydase deficiency. *J Inherit Metab Dis.*; 8: 193. 1985

58. Boright A, Scriver CR: Prolidase Deficiency: Biochemical Classification of Alleles *Am J Hum Genet.* 44: 731-740.; 1989
59. Ogata A. Tanaka T. Tomoda E. Murayama F. Endo F Kukuchi I. *Arah. Dermatol.* 117: 687-697.; 1981
60. Whang SH, Zhi QW, Sun MJ. Dual activities of human prolidase. *Toxicol In Vitro.* 20: 71-77.; 2006
61. Kurien BT, Patel NC, Porter AC, D'Souza A, Miller D, Matsumoto H, Wang H, Scofield RH. Prolidase deficiency and biochemical assays used in its diagnosis. *Anal Biochem.* 349(2): 165-175.; 2005;
62. Rubino A, Pierro M, La Toretta G, Vetrella M, Di Martino D and Auricchio S. Studies on intestinal hydrolysis of peptides: II. Dipeptidase activity toward I-glutamyl-I proline and glycyl-I-proline in the small intestine of the human fetus. *Pediatr Res.* 3: 313- 319.; 1969;
63. Davis NC, Smith EL: Purification and Some Properties of Prolidase of Swine Kidney, *J. Biol Chem,* 244:261-275, 1957
64. Noren O, Dabelsteen E, Sjostrom H and Josefsson L. Histological localization of two dipeptidases in the pig small intestine and liver, using immunofluorescence. *Gastroenterology.* 72: 87-92.; 1977;
65. Hui KS., Lajtha A: Prolidase activity in brain: Comparison with other organs. *J Neurochem* 30: 321-327.; . 1978
66. Hui KS, Weiss B, Hui M, Lajtha A. Covalent coupling of calf brain prolidase. *J Neurosci Res.* 3: 231-239.; 1977
67. Smith EL. The peptidase of skeletal, heart, and uterine muscle. *J Biol Chem.* 173: 553-569.; 1948;
68. Fruten JS, Smith VA, Driscoll PE. Makale ismi? *J Biol Chem.* 1948; 173: 457-469
69. Adams E, Davis NC, Smith EL. Specificity of prolidase: Effect of alterations in the pyrrolidine ring of glycyl-I-proline. *J Biol Chem* 208: 573-578.; . 1954
70. Powell GF, Kurosky A, Maniscalco RM. A prolidase deficiency: Report of a second case with quantitation of the excessively excreted amino acids. *J Pediatr.* 91: 242- 246.; 1977
71. Sheffield LJ, Schlesinger P, Faul K, Halpern BJ, Schier GM, Cotton RG, Hammond J, Danks Dm. İmino-peptiduria, skin ulcerations, and edema in a boy with prolidase deficiency. *J Pediatr.* 91: 578-583.; 1977

72. Myara I, Charpentier C, Lemonnier A. Optimal conditions for prolidase assay by proline colorimetric determination: Application to iminodipeptiduria. *Clin Chim Acta.* 125: 193-205; 1982
73. Endo F, Matsuda I. Screening method for prolidase deficiency. *Hum Genet.* 56: 349-351; 1981
74. Chinard P. Photometric determination of proline and ornithine. *J Biol Chem.* 199: 61-65.; 1952
75. Ohhashi T, Ohno T, Arata J, Sugahara K, Kodama H. Characterisation of prolidase I and II from erythrocytes of a control, a patient with prolidase deficiency and her mother. *Clin Chim. Acta.* 187 (1): 1-9; 1990
76. İyidoğan YÖ, Gürdöl F, Öner P: Serum prolidaz I aktivitesinin kemik yapım-yıkım indeksi olarak değerlendirilmesi. *İst.Tıp Fak.Mecmuası.* 62: 2.; 1999
77. Aksoy N., Çelik H. Selek Ş. Güzel S.Aslan M. Elçi K: Diyabetli hastalarda prolidaz aktivitesinin değerlendirilmesi. *Turk J Biochem;* 30 (1):1- 172.; 2005
78. Çelik H., Aksoy N., Aslan M. Nalgül Y.Barut Ş. Siroz Hastalarında Kollajen Metabolizmasının Bozulması *Turk J Biochem.* 29 (1): 1-172; 2005
79. Söner Y., Gürdöl F., Tuğrul Y., Bekpınar S: Prolidase I activity in liver tissue: effects of ethanol and selenium. *Res Commun Alcohol Subs Abuse.* 16: 125. 1995
80. Arata J., Umemura S., Yamamoto Y., Hagiyaama M., Nohara N: Prolidase deficiency: Its dermatological manifestations and some additional biochemical studies. *Arch Dermatol.* 115: 62. 1979
81. Zuyderhoudtf. M.C.BrugmanA. M.SmithJ. J.H.JongL.: Plasma prolidase in the rat; noindex of liver fibrosis. *Clinical Chemistry.* 31: 4.; 1985
82. OonoT, FujiwaraY, YoshiokaT, Arata J: Prolidase activity in chronic wound and blister fluids. *J Dermatol.* 24 (10): 626-629.; 1997
83. Yıldız Ş, Ay H, Elbüken ME, Caymaz O: Hiperbarik Oksijen ile Tedavi Edilen Olgularda Prolidaz Enzim Seviyeleri. *Gülhane Tıp Derg;* 46 (2) 144-148.; 2004
84. Chamson A, Voigtlander V :Collagen Biosynthesis Anomalies in Prolidase Deficiency.Effect of Glycl-L-Proline on the Degradation of Newly Synthesized Collagen.*Clin Physiol Biochem.* 7: 128-136.; 1989
85. Myara I, Miech G, Fabre M, Mangeot M, Lemonnier A:Changes in prolinase and prolidase activity during CCl₄ administration inducing liver cytolsis and fibrosis in rat *Br J Exp Pathol.* 68: 7.; 1987

86. Demirbag R, Yıldız A, Gur M, Yilmaz R, Elçi K, Aksoy N: Serum prolidase activity in patients with hypertension and its relation with left ventricular hypertrophy. *Clinical Biochemistry*. Accepted 29 May 2007.
87. Altındağ Ö, Erel Ö, Aksoy N, Selek Ş, Çelik H, Karaoğlanoğlu M: Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis. *Rheumatology International*. Published online:10 November 2006.
88. Aslan M, Nazlıgöl Y, Horoz M, Bölükbaş C, Bölükbaş F, Aksoy N, Çelik H, Erel Ö: Serum prolidase activity and oxidative status in helicobacter pylori Infection. *Clinical Biochemistry*; Jan;40 (1-2): 37-40; 2007

