



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**GLUTATYON (GSH) DÜZEYİNİN PLASENTADA
ARAŞTIRILMASI**

Yelda KASAP

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Benay Can EKE**

2010-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLUTATYON (GSH) DÜZEYİNİN PLASENTADA
ARAŞTIRILMASI**

Yelda KASAP

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Benay Can EKE

2010-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07/07/2010



Prof. Dr. Mümtaz İŞCAN

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Jüri Başkanı



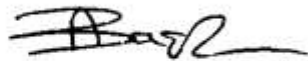
Prof. Dr. Benay Can EKE

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
(Danışman)



Prof. Dr. Tülay ÇOBAN

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi



Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi



Prof. Dr. Orhan ADALI

ODTÜ Fen Edebiyat Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Plasenta	1
1.1.1. Plasentanın Oluşumu	1
1.1.2. Plasentanın Yapısı	4
1.1.3. Plasentanın Fonksiyonları	4
1.1.3.1. Plasental Metabolizma	5
1.1.3.2. Plasental Endokrin Sentezi ve Sekresyonu	5
1.1.3.2.1. Steroid Hormonlar	5
1.1.3.2.2. Protein Hormonlar	6
1.1.3.3. Plasental Transport	6
1.1.4. Plasentada Kimyasalların Metabolizması	8
1.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	10
1.2.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları	10
1.2.2. Reaktif Oksijen Türleri	13
1.2.2.1. Süperoksit Radikali	13
1.2.2.2. Hidroksil Radikali	14
1.2.2.3. Hidrojen Peroksit	15
1.2.2.4. Singlet Oksijen	15
1.2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri	16
1.2.3.1. DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri	17
1.2.3.2. Proteinlere Etkileri	17
1.2.3.3. Lipitlere Etkileri	18
1.2.4. Antioksidan Savunma Sistemi	19
1.2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar ve Etkileri	20
1.2.4.2. Non Enzimatik Antioksidanlar ve Etkileri	20
1.3. Glutasyon	21
1.3.1. Glutasyonun Sentezi	22
1.3.2. Glutasyon Metabolizması	25
1.3.2.1. Glutasyon Peroksidaz	25

1.3.2.2. Glutasyon Redüktaz	26
1.3.2.3. Glutasyon-S-Transferaz	27
1.3.3. Hücrelerde Glutasyonun Varlığı ve Fonksiyonları	29
1.3.3.1. Hücrede Glutasyon Düzeyinin Azalması	33
1.3.3.2. Hücrede Glutasyon Düzeyinin Arttırılması	34
1.3.4. Glutasyon Analiz Metotları	35
1.3.4.1 Spektrofotometrik Yöntem	35
1.4. Sigara	38
1.4.1. Sigaranın İçeriği	39
1.4.1.1. 1-Hidroksi Piren	40
1.4.2. Gebelikte Sigara Kullanımı	41
2.GEREÇ VE YÖNTEM	44
2.1. Gereçler	44
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	44
2.1.2. Kullanılan Araçlar	45
2.1.3. Kullanılan Numunelerin Temini	46
2.2. Yöntem	46
2.2.1. Dokuların Eldesi	46
2.2.2. Plasentada Glutasyon Tayini	47
2.2.2.1. Reaksiyon Ortamı	47
2.2.2.2. İşlem	47
2.2.2.3. Standart	48
2.2.2.3.1. GSH Standart Çözeltisinin Hazırlanması	48
2.2.2.3.2. GSH Standart Kalibrasyon Eğrisi	49
2.2.3. İdrarda 1-OHP Tayini	50
2.2.3.1. Yöntemin Kromatografik Şartları	50
2.2.3.2. Çözeltilerin Hazırlanması	50
2.2.3.2.1. 0,1 M Asetat Tampon Çözeltisi	50
2.2.3.2.2. 1-OHP Başlangıç Çözeltisi	51
2.2.3.2.3. 1-OHP Stok Çözeltisi	51
2.2.3.2.4. Dilüe 1-OHP Stok Çözeltisi	51
2.2.3.2.5. Kalibrasyon Standartları	51
2.2.3.3. İdrar Örneklerinin Analiz için Hazırlanması	52
2.2.3.4. İdrarda 1-OHP'nin HPLC ile Tayin Yönteminin Validasyonu	52
2.2.3.4.1. Özgünlük ve Seçicilik	53
2.2.3.4.2. Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Alt Limiti (LOQ)	53
2.2.3.4.3. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık	53
2.2.3.4.4. Doğruluk ve Kesinlik	54
2.2.3.4.4.1. Gün İçi Tekrarlanabilirlik	54
2.2.3.4.4.2. Gün Arası Tekrarlanabilirlik	54
2.2.3.4.5. Geri Kazanım	54

2.2.4. Kreatinin Tayini	54
2.2.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması	55
2.2.4.2. Standart	55
2.2.4.3. İşlem	57
2.2.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntem	57
3. BULGULAR	58
3.1. İnsan Plasentasında Glutatyon Düzeyleri	58
3.2. İdrarda 1-OHP'nin HPLC ile Tayin Yönteminin Validasyon Sonuçları	63
3.2.1. Özgünlük ve Seçicilik	63
3.2.2. Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Alt Limiti (LOQ)	65
3.2.3. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık	65
3.2.4. Doğruluk ve Kesinlik	67
3.2.4.1. Gün İçi Tekrarlanabilirlik	67
3.2.4.2. Gün Arası Tekrarlanabilirlik	67
3.2.5. Geri Kazanım	68
3.3. İdrarda Kreatinin Ölçümleri	69
3.4. İdrarda 1-OHP Düzeyleri	71
4. TARTIŞMA	80
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	84
ÖZET	85
SUMMARY	86
KAYNAKLAR	87
EKLER	
Ek-1: Anket Formu	99
Ek-2: Gönüllü Bilgilendirme Formu	100
Ek-3: Etik Kurul Onayı	104
ÖZGEÇMİŞ	106

ÖNSÖZ

Sigara içimi dünyadaki en önemli sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. Gebelikte sigara içilmesi veya ortamdaki sigara dumanının solunması, fertilitiyi, fetüsün gelişmesini, gebeliğin her safhasını, doğumu, bebek sağlığını ve gelişimini etkileyebilmektedir. Gebelikte sigara içiminin pek çok olumsuz etkisi bilinmesine rağmen bu konudaki yeni araştırmalar sigaranın bilinmeyen etkilerini ortaya çıkarmak için devam etmektedir. Bu çalışmada koruyucu mekanizmadan sorumlu glutasyon düzeyinin plasentada ölçümü, patogeneğinde kimyasala maruziyetin bulunduğu çeşitli hastalıklarda antioksidan savunma mekanizmalarının durumu hakkında bilgi verecektir. Ayrıca plasental glutasyon düzeyinin 1-OHP düzeyi ile olan ilişkisi incelenecektir. Bu çalışma sonuçlarının, gebelikte görülebilecek sorunları kapsayan diğer çalışmalara katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, hoşgörü ve sabırla her konuda beni destekleyen, çalışmalarım sırasında yaşadığım zor anlarda hiç çekinmeden danışabildiğim tez danışmanım sayın Prof. Dr. Benay Can EKE'ye,

Gerek bilimsel gerekse sosyal desteğini hiç esirgemeyen, yapıcı tutumuyla motivasyonumu arttıran, sıkıntılı anlarımda arkadaşlığından çok destek aldığım araştırma görevlisi sevgili Elçin Deniz Özdamar'a,

Tezimin istatistik ve HPLC kullanımı aşamasında yardımlarını esirgemeyen pratik ipuçlarıyla bana önemli katkılar sağlayan Dr. Ecz. Ahmet Oğuz Ada'ya,

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Toksikoloji Anabilim Dalı tüm öğretim üyeleri ve çalışanlarına,

HPLC yöntem validasyonu ve ölçümlerinde bana yardımcı olan yol gösteren kimyager Hale Aydonat'a,

Aldığım tüm kararlarda beni destekleyerek bugünlere gelmemde büyük payları olan, emeklerini asla ödeyemeyeceğim sevgili anneme, babama ve her zaman yanımda olan manevi desteğini sürekli hissettiğim biricik ablama,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin Trifosfat
CAT	Katalaz
CYP450	Sitokrom P450
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
FDA	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç İdaresi)
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	Glutasyon Disülfid
GST	Glutasyon-S-Transferaz
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
MDA	Malondialdehit
NADP ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat, indirgenmiş
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
RSD	Rölatif Standart Sapma
SOD	Süperoksit Dismutaz
TNB	Tiyonitrobenzoik Asit
1-OHP	1-hidroksi piren

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Plasentanın oluşumu	3
Şekil 1.2. Placenta	4
Şekil 1.3. Oksidatif stres	19
Şekil 1.4. Glutasyonun moleküler yapısı	21
Şekil 1.5. Glutasyon sentezi	23
Şekil 1.6. Glutasyon redoks siklusu	27
Şekil 1.7. Glutasyon ile etkileşime giren ve idrar-feçesten merkaptürük asit formunda atılan ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu	30
Şekil 1.8. Oksidatif stresten korunmada GSH'ın antioksidant fonksiyonlarının şematik gösterimi	32
Şekil 1.9. Glutasyonun DTNB ile reaksiyonu	37
Şekil 2.1. GSH standart eğrisi	49
Şekil 2.2. Kreatinin kalibrasyon eğrisi	56
Şekil 3.1. 1-OHP içermeyen idrar örneğine ait kromatogram	64
Şekil 3.2. 10 nM düzeyinde 1-OHP eklenmiş idrar örneğine ait kromatogram	64
Şekil 3.3. 1-OHP eklenmiş idrar örneklerinde yapılan analizlerden elde edilen alan ile konsantrasyon arasındaki korelasyonu gösteren grafik	65
Şekil 3.4. 1-OHP eklenmiş metanol çözeltilerinden elde edilen alan ile konsantrasyon arasındaki korelasyonu gösteren grafik	66
Şekil 3.5. Sigara içen bireylerin plasental glutasyon düzeyleri ile idrar 1-OHP düzeylerinin karşılaştırılması	76
Şekil 3.6. Sigara dumanına maruz kalan bireylerin plasental glutasyon düzeyleri ile idrar 1-OHP düzeylerinin karşılaştırılması	77
Şekil 3.7. Sigara içmeyen bireylerin plasental glutasyon düzeyleri ile idrar 1-OHP düzeylerinin karşılaştırılması	78

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. ROT'ların in vivo ortamda kaynakları	12
Çizelge 1.2. Reaktif oksijen türleri	13
Çizelge 2.1. GSH ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları	47
Çizelge 2.2. Kalibrasyon standartları için gerekli çözelti miktarları	56
Çizelge 3.1. Plasenta ve idrar numuneleri alınan bireylerin genel özellikleri	58
Çizelge 3.2. İnsan plasentasında glutatyon düzeyleri	59
Çizelge 3.3. Sigara içen bireylerin plasentalarında glutatyon düzeyi ölçümü	61
Çizelge 3.4. Sigara dumanına maruz kalan bireylerin plasentalarında glutatyon düzeyi ölçümü	61
Çizelge 3.5. Sigara içmeyen bireylerin plasentalarında glutatyon düzeyi ölçümü	62
Çizelge 3.6. Sigara kullanımı ile GSH ilişkisi	63
Çizelge 3.7. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmaları	67
Çizelge 3.8. Gün arası tekrarlanabilirlik çalışmaları	68
Çizelge 3.9. Geri kazanım çalışmaları	68
Çizelge 3.10. İdrar numunelerindeki kreatinin (mg/100ml) düzeyleri	69
Çizelge 3.11. İdrarda 1-OHP düzeyleri	71
Çizelge 3.12. Sigara içen bireylerin idrarlarında 1-OHP düzeyleri	73
Çizelge 3.13. Sigara dumanına maruz kalan bireylerin idrarlarında 1-OHP düzeyleri	73
Çizelge 3.14. Sigara içmeyen bireylerin idrarlarında 1-OHP düzeyleri	74
Çizelge 3.15. Çalışmaya katılan bireylerin idrarlarında 1-OHP düzeyleri	75
Çizelge 3.16. Sigara içen bireylerin plasentalarında glutatyon düzeyleri ve idrarlarında 1-OHP düzeyleri	75
Çizelge 3.17. Sigara dumanına maruz kalan bireylerin plasentalarında glutatyon düzeyleri ve idrarlarında 1-OHP düzeyleri	76
Çizelge 3.18. Sigara içmeyen bireylerin plasentalarında glutatyon düzeyleri ve idrarlarında 1-OHP düzeyleri	77

Çizelge 3.19. Çalışmaya katılan bireylerin plasental GSH düzeyleri ile idrar 1-OHP düzeyleri arasındaki korelasyon sonuçları

79

1. GİRİŞ

1.1. Plasenta

Plasenta geçici bir organ olup embriyo ve fetüsün normal gelişimine imkân veren uygun bir mikro çevrenin sağlanmasında hayati rol oynamaktadır.

Anne ile fetüs arasındaki besleyici maddelerin, oksijen ve atık değişiminin yapıldığı başlıca yerdir. Fetüse oksijen ve besini anneden alarak sağlamakta ve aktif endokrin hormon görevini görmektedir. Bu durum plasentanın vücuttaki eşsiz bir organ sistemi olmasına olanak sağlamaktadır (Syme ve ark., 2004).

Plasenta aracılığıyla anne ve fetüs kanı birbirine karışmaksızın, ikisi arasında madde alışverişi sağlanmaktadır. Yani fetüs yaşayıp büyüebilmek için anne kanından gerekli besin maddelerini ve oksijeni almakta, karbondioksit gibi kendisine gereksiz maddeleri anne kanına vermektedir. Anne solunum yoluyla bunu dışarı atmaktadır. Özetle plasenta, fetüsün hem akciğeri, hem sindirim sistemi hem de böbrekleri gibi görev yapmaktadır (Myllynen ve ark., 2005).

Plasenta, iki bölüm arasındaki sirkülasyonu sağlarken bir taraftan da maternal kanında yer alan ksenobiyotiklerden fetüsü korumak için bariyer görevini görmektedir. Fetüsün ve annenin sirkülasyonu aynı anda perfüze edilirken plasenta anne ve fetüsün kanlarını birbirinden ayırmaktadır (Smith ve ark., 1992).

1.1.1. Plasentanın Oluşumu

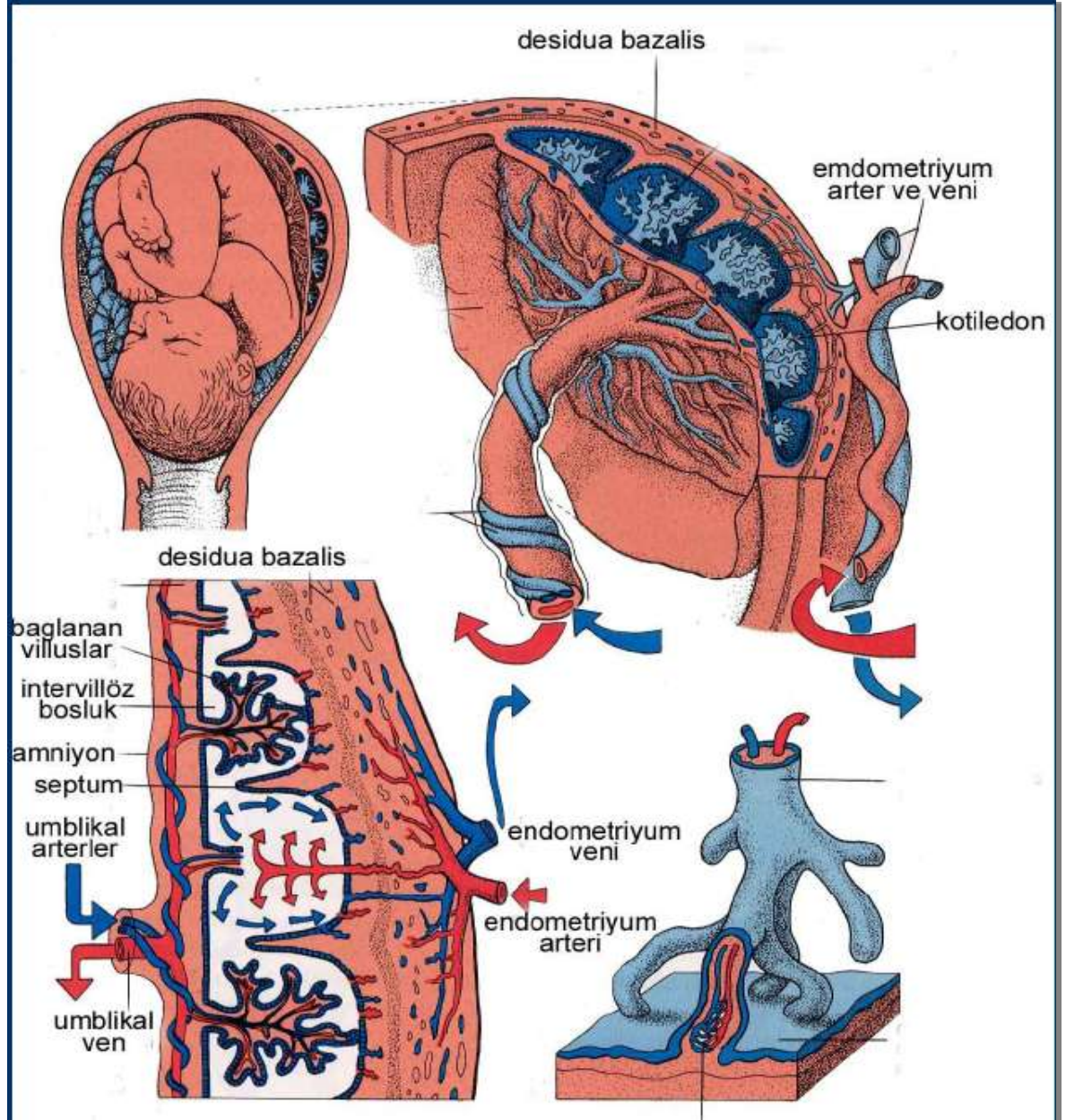
Plasenta, gebeliğin çok erken dönemlerinde oluşmaktadır. Plasenta hemokoryal tiptedir yani fetal dokusu maternal kanı ile direk temastadır (Kaufmann ve Scheffen,

1992). Embriyo rahim duvarı içine yerleştikten sonra beliren trofoblast adlı hücreler sayıca çoğalmaya ve desiduaaya doğru ilerlemeye başlamaktadır. Desidua, gebe bir kadında endometriyumun fonksiyonel tabakasıdır. Yani zigotun yerleşip gelişebileceği uygun bir yataktır. Trofoblastlar yan yana gelip parmak gibi uzantılar oluşturarak desiduaaya çıkıntı yapmaktadırlar. Bu uzantılara “Plasenta villusları” denir. Villus, insan plasentasının temel yapısal elemanıdır, maternal yüz ile desiduaal membranın çevresinde yer almaktadır. Fetal villus dokuları, fetal kapillerin endometriyumu ve trofoblasttan (villus stroma, sitotroplast ve sinsityotroplast) oluşan fetal ve maternal sirkülasyonu birbirinden ayırmaktadır (Peereboom ve Noordhoek, 1998). Erken gebelik döneminde villus doku tabakası yaklaşık 50–100 µm kalınlıktayken gebeliğin son dönemlerinde plasentanın büyümesiyle 4–5 µm’ye kadar düşmektedir (Kaufmann ve Scheffen, 1992). Bu inceltme sitotroplastik tabakanın ortadan kaybolmasından kaynaklanmaktadır (Peereboom ve Noordhoek, 1998). Gebeliğin erken dönemlerinde koryonun tüm yüzeyi villuslarla kaplıyken, gebelik ilerledikçe iki bölgenin farklılığı görülmektedir. Fetal kutbun desidua bazalis (anneye ait plasentayı oluşturan desidua tabakası) ile temasta olan villusları büyümeye devam etmektedir. Embryosuz tarafta ise villuslarda yıkım başlamaktadır. Böylece üçüncü ayın sonunda koryonun bu tarafı düz kalmaktadır. Buna karşılık geri kalan uzantılı koryon frondozum gelişip esas plasentayı oluşturmaktadır. Bu dönemde plasenta iki bölümden oluşmaktadır; ilk bölüm farklılaşmış desiduedan oluşmuş maternal (anneye ait) kısım, diğer bölüm koryon kesesinden gelişen fetal kısımdır (Şekil 1.1) (Lewis ve Gilbert, 1998).

Plasentada biyokimyasal sentez ve değiş tokuş için mitokondri, ribozom, pinositotik vaküoller, lipid duvarı gibi organeller bulunmaktadır. İnsan plasentası, kotiledon adı verilen 20–40 bölümden oluşmaktadır. Bu bölümlerden her biri plasentanın bir damarı gibi görev almaktadır. Bütün kotiledonlar plasentanın fetal tarafında yer alan villus ağaçlarını içermektedir (Enders ve Blankenship, 1999).

Gebeliğin ilk iki ayında, embriyonun major organları gelişmektedir (organogenesis). Son iki ayda embriyo fetüse dönüşmektedir. Embryonik periyod süresince maternal kan plasentaya perfuze olmamaktadır ve gebeliğin 10. haftasına kadar fetoplental-

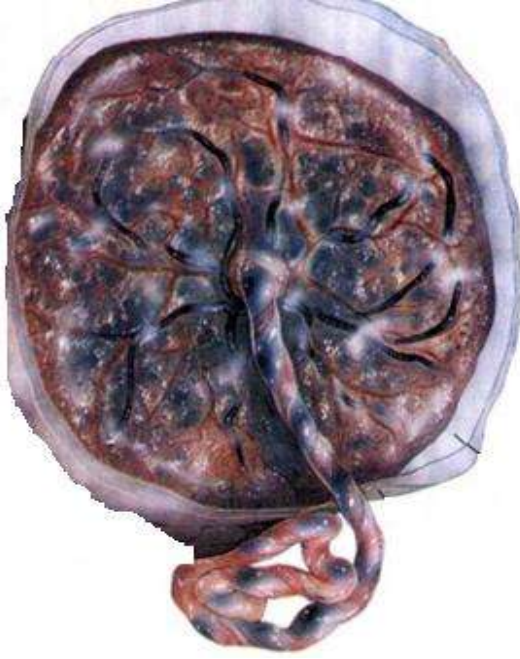
maternal sirkülasyon yıkılmamaktadır. Fakat maternal kanda bulunan ilaçlar veya diğer kimyasallar gebeliğin ilk 10 haftasında embriyoya, ekstrasellüler sıvıya difüze olarak geçebilmektedir (Syme ve ark., 2004).



Şekil 1.1. Plasentanın oluşumu

1.1.2. Plasentanın Yapısı

Gelişimini tamamlamış plasenta yaklaşık 20–22 cm çapında, 2–2,5 cm kalınlığında ve 500–600 gr ağırlığındadır. Mavi- kırmızı renkte, yuvarlakça, yassı ve etli bir



organdır (Şekil 1.2). Plasentanın en küçük anatomik birimi kotiledondur. İki veya daha fazla kotiledonun bir araya gelmesiyle lobüller oluşmaktadır. 15–20 adet lobül bulunmaktadır. 1. trimestr'de plasentanın boyutu fetüsten büyükken, 12–14. haftada plasenta büyüklüğü fetüsle yaklaşık olarak eşittir, 14. haftadan sonra fetüsün boyutu plasentayı geçmektedir. Plasenta gebeliğin yaklaşık 18. haftasına kadar büyümeye devam etmektedir (Myatt, 2006).

Şekil 1.2. Plasenta

1.1.3. Plasentanın Fonksiyonları

Plasentanın temel görevi, gelişmekte olan gebeliğin devamı ve normal fetüs gelişiminin sağlanması için gerekli besleyici molekülleri, iyonları ve gazları anneden fetüse aktarmak, fetüsün metabolizması sonucu oluşan atık ürünlerin maternal dolaşımına geçmesini sağlamaktır (Myatt, 2006). Ayrıca başarılı bir hamilelik için çok önemli olan hormonların, peptitlerin ve steroidlerin sentezinde önemli rol oynamaktadır. İnsan plasentası ilaç oksidasyonu, redüksiyonu, hidrolizi ve konjugasyonundan sorumlu çoklu enzim sistemleri içermektedir. Bu enzim sistemleri sayesinde plasentaya geçen yabancı kimyasallar modifiye edilebilmektedir (Syme ve ark., 2004).

Plasentanın üç temel fonksiyonu vardır.

1.1.3.1. Plasental Metabolizma

Özellikle erken gebelik döneminde plasenta, embriyo ve fetus için besin ve enerji kaynağı oluşturan glikoz, kolesterol ve yağ asitlerini sentezlemektedir. Plasentanın bazı vitaminleri, lipitleri, glikojeni ve demiri depolama özelliği bulunmaktadır (Beausejour ve ark., 2007). Metabolizma oranı yetişkin karaciğeri ve böbreği ile benzerdir. Oksijen tüketimi pankreas ve böbrekteki gibi aynı şekilde gerçekleşmektedir. Plasenta aktif glikoz siklus, trikarboksilik siklus, elektron transfer sistemi gibi katabolik ve sentetik fonksiyonları düzenlemektedir (Luke, 2007).

1.1.3.2. Plasental Endokrin Sentezi ve Sekresyonu

Plasentanın fonksiyonel hücreleri olan sinsityotrofoblastlarda steroid hormonlar ve protein hormonların üretimi yapılmaktadır (Roberts ve ark., 2009).

1.1.3.2.1. Steroid Hormonlar

Progesteron, gebeliğin her döneminde görülmektedir. Gebeliğin sağlıklı devam etmesi için gereklidir, fetüsün yerleştiği endometriyumu desteklemektedir. Rahim kaslarının kasılmasını baskılamakta böylece düşük ya da erken doğumu engellemektedir. Gebeliğin sonuna doğru anne organizmasına verilen günlük plasental progesteron miktarı yaklaşık 200–500 mg arasındadır (Pschyrembel, 1998).

Östrojen, plasentada sinsityotrofoblastlardan sentezlenmektedir. Biyosentez ve metabolizmasında fetus adrenalleri, fetus karaciğeri, anne karaciğeri ve böbrekleri rol almaktadır. Rahim kası üzerinde oksitosin hormonunun bağlanacağı reseptörlerin

yapımını hızlandırarak rahimi doğuma hazırlamaktadır. RNA yapımını ve protein sentezini uyarmaktadır (Nakagava ve ark., 2004).

1.1.3.2.2. Protein Hormonlar

Protein hormonlar sinsityotroblastlardan sentezlenmektedir. Üretilen başlıca hormonlar: gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH), tirotropin salgılatıcı hormon (TRH), somatostatin, koryonik gonadotropin hormonu (HCG), koryonik tirotropin hormonu (HCT)'dur (Petraglia ve ark., 1992).

1.1.3.3. Plasental Transport

Besleyici maddeler ve gazlar plasenta aracılığıyla plasenta villuslarından fetüs kanına geçmektedir. Plasenta ve anne kanı arasında iki yönlü madde taşınması, plasenta bariyerinin çok geniş bir yüzey içermesi nedeniyle kolaylaşmıştır. Bazı maddeler plasentadan olduğu gibi geçerken bazıları geçiş sırasında metabolize olmakta bazıları ise hiç geçmemektedir. Plasenta, anne kanındaki bazı zararlı maddelerin fetüse geçişini engellemektedir (Perkins, 2006).

Oksijen ve karbondioksit gibi gazların geçişi kan akımının oluşturduğu basınç farkıyla gerçekleşmektedir. Oksijence zengin anne kanından oksijence fakir fetal kanına doğru oksijen geçişi olmaktadır ve bebek kanındaki hemoglobin oranı fazla olduğu için bebek kanı dokulara kolayca oksijen taşımaktadır (Sanin ve Lopez, 2001).

Plasenta, çeşitli ksenobiyotiklerin anneden fetüse geçişini azaltarak gelişen fetüs için koruyucu bariyer görevini üstlenmektedir. Bu nedenle plasenta ksenobiyotiklerin eliminasyonunda böbrek ve karaciğer gibi rol oynamaktadır. Maternalden fetale pasif difüzyon yolu ile ilaç geçiminde; ilacın lipit çözünürlüğü, polaritesi, molekül ağırlığı

gibi fizikokimyasal özellikleri belirleyici olmaktadır. Plazenta membran geçirgenliğine bağlı olarak düşük molekül ağırlıklı, yağda çözünen ve non iyonize bileşikler kolayca plasentaya geçebilmektedir. Ayrıca, plazma proteinlerine bağlanma derecesi de geçen madde miktarını etkilemektedir (Hill ve Abramson, 1988).

Glukoz, aminoasit, vitamin ve insülin gibi maddeler plasentaya sınıtyotroblastların maternal yüzeyel apikal (brush border) membranlarında ve fetal yüzeyel basal membranlarında bulunan özel transport mekanizmalarla geçmektedir. Ayrıca spesifik transport mekanizmasıyla fetal kanındaki metabolik artık ürünleri maternal sirkülasyona plasentayla geçip temizlenmektedir (Hahn ve Desoye, 1996).

Transplasental değiş tokuş 4 mekanizma ile gerçekleşmektedir (Pacifici ve Nottoli, 1995).

1. Pasif Difüzyon

Pasif difüzyon, plasental taşımada baskın bir yoldur. Düşük molekül ağırlıklı, non iyonize, yüksek oranda yağda çözünebilen kimyasallar için uygundur. Enerji gerektirmeden aralarında bir denge kuruluncaya kadar maddelerin yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru hareket etmesiyle gerçekleşmektedir. Kimyasallar plasentaya pasif difüzyon ile geçtiğinde, geçiş yapan maddenin miktarını; maternal sirkülasyondaki kimyasalın konsantrasyonu, fizikokimyasal özelliği ve plasentanın özelliği belirlemektedir. Su, elektrolitler, inorganik iyonlar ve oksijen, karbondioksit gibi gazlar pasif difüzyon ile taşınmaktadır (Nau, 1992; Johansson ve ark., 2002).

2. Kolaylaştırılmış Difüzyon

Bir taşıyıcı substrat aracılığı ile plasenta ve fetüs arasında yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru denge sağlanıncaya kadar geçiş olmaktadır (Folkart ve ark., 1960). Elektriksel yüklere bağlı bir taşımadır. Karbonhidrat gibi bazı maddelerin taşınmasında fetüsün fonksiyonel ve metabolik ihtiyaçları olduğunda sadece pasif difüzyonla değil kolaylaştırılmış difüzyonla da transfer oranı arttırılabilmektedir (Pacher ve ark., 2007).

3. Aktif Taşıma

Aktif taşımada enerji kullanılmaktadır. Bu enerji ATP (adenozin trifosfat) hidrolizinden veya transmembran elektrokimyasal gradientte saklanan enerjiden sağlanmaktadır. Şeker, aminoasit, lipit gibi moleküller aktif taşıma ile taşınmaktadır (Seeds, 1968; Radi, 2004).

4. Endositoz

İri moleküller endositoz ile taşınmaktadır.

Gebelikte annenin çevresel toksinlere, ksenobiyotiklere, ilaçlara maruziyeti fetüsün de bu risklere maruz kalabileceğinin habercisidir.

1.1.4. Plasentada Kimyasalların Metabolizması

Plasenta, ksenobiyotikler için metabolik bariyer olarak görev almaktadır fakat bu görev birçok ilaç ve kimyasalın plasental metabolizması için minör derecededir ve plasentaya geçişi önleyecek birincil faktör değildir. Birçok durumda enzim aktivitelerinin ksenobiyotik bileşiklerini fetüs için zararlı hale getirdiği bilinmektedir (Pasanen ve Pelkonen, 1994).

Faz I Reaksiyonları

CYP (sitokrom P450) enzimleri steroid hormonların katabolizması, sentezi ve vitamin, yağ asitleri, ilaçlar ve toksik kimyasalların metabolizmasından sorumludur (Murray, 1992). Plasentanın trofoblastik hücrelerinin mitokondri, endoplazmik retikulumlarında çeşitli CYP izoenzimleri mevcuttur. Fullterm plasentada, CYP 1A1, 1B1, 2E1, 2F1, 3A3-7 ve 4B1 için mRNA'lar tespit edilmiştir ve CYP 2E1, 1A1, 3A4, 3A5, 3A7 ve 4B1 protein düzeyinde karakterizedir (Cui ve ark., 2006). Maternalin sağlık durumu, gebeliğin periyoduna bağlı olarak CYP'lerin tipleri ve miktarları ile değişmektedir. Genel olarak term'e göre ilk trimestr'de CYP izoformları daha fazla bulunmaktadır (Nelson ve ark., 2003).

Faz II Reaksiyonları

Faz I reaksiyonları sonucu oluşan metabolitlerin polar hale gelmesini sağlayan böylece vücuttan atılımını kolaylaştıran konjugasyon reaksiyonlarıdır. Faz II reaksiyonları glukuronik asit konjugasyonu, sülfat konjugasyonu, metilasyon, açılasyon, glutatyon konjugasyon reaksiyonlarıdır.

Plasentada ilacı metabolize eden enzimlerin seviyesini maternal ve çevresel faktörler etkilemektedir. İlaç, sigara-alkol kullanan, hava kirliliğine maruz kalan, sağlıksız beslenen annelerde plasental ksenobiyotik-metabolize aktivitesi değişmektedir (Collier ve ark., 2002).

Gebelik, vücudun metabolik ihtiyaçlarının ve dokuların oksijen gereksiniminin arttığı bir dönemdir. Çalışmalar gebelik döneminde maternal siklusunda lipit peroksidlerin anlamlı olarak arttığını göstermektedir (Sarker ve ark., 1995; Spatling ve ark., 1992). Hamilelik süresince plasentaya geçebilen veya plasentanın enzim aktiviteleri sonucu ürettiği reaktif oksijen türlerinin plasental fonksiyonları ne yönde değiştirdiğine dair çalışmalar devam etmektedir.

1.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşlenmemiş elektron bulunan, bu eşlenmemiş elektronlar sayesinde oldukça reaktif ve kararsız olan moleküllerdir. Kararlı hale gelebilmek için diğer atom veya moleküllerle birleşmeye çalışırlar. Başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller denir (Halliwell, 1994).

Oksidan moleküller, reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif nitrojen türleri (RNS), sülfür merkezli radikaller ve diğerleri olarak sınıflandırılabilirler. Bütün reaktif türler radikal değildir. Radikal olmayan reaktif türler pek çok durumda radikal gibi davranmakta ve biyomoleküllere oksidasyon yolu ile zarar vermektedirler. Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan oksidasyon ürünlerine radikaller denir ve bunlar başka reaksiyonların oluşmasına neden olmakta ve daha büyük hasarlar meydana getirmektedirler (Abuja ve Albertini, 2001). Serbest radikallerin en önemli tepkimeleri, moleküler oksijenin ve onun reaktif türlerinin (süperoksit anyonu ve hidroksil radikali), peroksidin ve geçiş metallerinin olduğu tepkimelerdir (Inoue ve ark., 2003).

Serbest radikallerin hücre dışı etkileri hücreler arası boşluk ve sıvılarda ortaya çıkmaktadır. Serbest radikallere bağlı olduğu düşünülen klinik durumlar başta bağışıklık sistemi bozuklukları, iskemik durumlar, beslenme bozuklukları, madde ve toksinlerin yol açtığı reaksiyonlar olmak üzere; karaciğerden göze kadar tüm organları içine alabilmektedir (Cross, 1987).

1.2.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları

Reaktif oksijen türlerinin kaynakları Çizelge 1.1'de görülmektedir. Serbest radikaller vücutta doğal metabolizma sonucu endojen kaynaklardan ortaya çıkabildiği gibi ısı, ışık, radyasyon gibi çeşitli ekzojen kaynakların etkisi ile de ortaya çıkabilmektedir. Endojen kaynaklar içerisinde mitokondriyal elektron transportu, heksoz monofosfat

yolu, ksenobiyotiklerin metabolizması, doğal uyaranla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biyosentetik ve biyokimyasal yıkım olayları bulunmaktadır. (Fridowich 1978; Karabulut ve Kabakçı, 1995; Inoue ve ark., 2003).

Mitokondrilerde yüksek oranda hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri üretilmektedir (Wu ve Cederbaum, 2003). Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olmakta ve bu sırada ROT'lar oluşmaktadır (Cross, 1987).

Nötrofiller, eozinofiller ve makrofajlar diğer endojen ROT kaynaklarıdır. Aktive makrofajlarda oksijen tüketimi yükselmekte süperoksit anyonu ve nitrik oksit gibi radikaller ve hidrojen peroksit açığa çıkmaktadır (Conner ve Grisham, 1996).

İskemi, hemoraji, travma ve radyoaktivite gibi durumlarda mitokondrilerdeki aerobik oksidatif fosforilasyon dengesi etkilenmekte ve elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları daha fazla olmaktadır ve ROT düzeyi artmaktadır. ROT'ların düzeyi, yaşlanma süreci ile paralel bir artış göstermektedir. Yaşlanma ile protein karboksilasyonunun artışı ve katalize edici tüm enzimlerin azalmasının bu dengesizlikte önemli rolleri vardır (Çavdar ve ark., 1997).

Sitokrom P450 bir diğer endojen ROT kaynağıdır. P450'nin katalitik döngüsünde meydana gelen bir ayrılma veya aksamada süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşumu çoğunlukla meydana gelmektedir. Ayrıca mikrozomlar ve peroksizomlar da endojen ROT kaynaklarıdır (Gupta ve ark., 1997)

ROT üretimi ekzojen kaynaklı da olabilmektedir. Radyasyon, UV ışığı, kirli hava, sigara dumanı, pestisitler, ilaç maruziyeti serbest radikal üretimine neden olabilmektedir (Wu ve Cederbaum, 2003).

Çizelge 1.1. ROT'ların in vivo ortamda kaynakları (Çavdar ve ark., 1997).

I.	Normal biyolojik işlemler
	1. Oksijenli solunum
	2. Katabolik ve anabolik işlemler
II.	Oksidatif stres yapıcı durumlar
	1. İskemi, hemoraji, travma, radyoaktivite, intoksikasyon
	2. Ksenobiyotik maddelerin etkileri
	a. İn hale edilenler
	b. Alışkanlık yapan maddeler
	c. İlaçlar
	3. Oksidan enzimler
	a. Ksantin oksidaz
	b. İndolamin dioksigenaz
	c. Triptofan dioksigenaz
	d. Galaktoz oksidaz
	e. Siklooksigenaz
	f. Lipooksigenaz
	g. Monoamin oksidaz
	4. Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
	5. Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelial hücreler)
	6. Uzun süreli metabolik hastalıklar
	7. Diğer nedenler: aşırı sıcağa maruz kalma, güneş ışını, sigara
III.	Yaşlanma süreci

1.2.2. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri, kimyasal olarak reaktif olan çok sayıda molekülü kapsamaktadır. Çizelge 1.2’de ROT’ların sınıflandırılması görülmektedir.

Çizelge 1.2. Reaktif oksijen türleri (Çavdar ve ark., 1997)

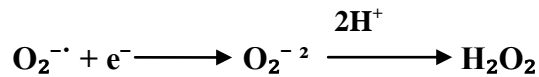
<p>1.Serbest Radikaller:</p> <p style="text-align: center;">Süperoksit radikali (O_2^{\cdot})</p> <p style="text-align: center;">Hidroksil radikali (OH^{\cdot})</p> <p style="text-align: center;">Alkoksil radikali (LO^{\cdot})</p> <p style="text-align: center;">Peroksil radikali (LOO^{\cdot})</p>
<p>2.Radikal Olmayanlar:</p> <p style="text-align: center;">Hidrojen peroksit (H_2O_2)</p> <p style="text-align: center;">Lipit hidroperoksit (LOOH)</p> <p style="text-align: center;">Hipoklorik asit (HOCl)</p>
<p>3.Singlet Oksijen</p>

1.2.2.1. Süperoksit Radikali (O_2^{\cdot})

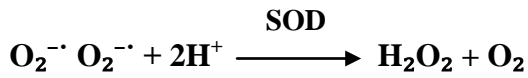
İndirgeyici özellikteki biyomoleküller, oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşmaktadır (Nordberg ve Arner, 2001). Birçok biyolojik molekül (hidrokinon, flavin, tiyol gibi) aerobik ortamda oksitlenirken

süperoksit yapımına neden olmaktadır. Süperoksidin kendisi direkt olarak fazla zarar vermemektedir. Asıl önemi hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı olmasıdır. Süperoksit radikali H_2O_2 'ye indirgendiğinde en aktif halini alır (Kavas, 1989; Desideri ve Falconi, 2003).

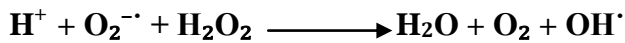
Süperoksit radikali bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenir.



Bu tepkime biyolojik moleküllerin oksidasyonuna neden olduğundan tercih edilmemektedir. Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2 'ye çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenmektedir (Desideri ve Falconi, 2003).



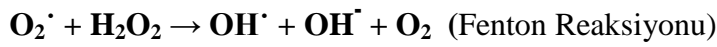
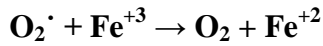
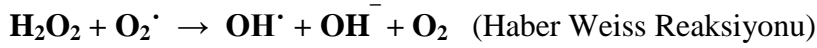
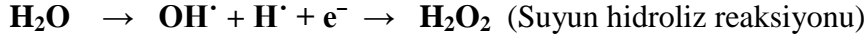
Süperoksit radikali aynı zamanda hidrojen peroksit ve hidrojen iyonlarıyla reaksiyona girerek daha reaktif olan hidroksil radikalini oluşturabilmektedirler (Akkuş, 1995; Delibaş ve Özcankaya, 1995).



1.2.2.2. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})

H_2O_2 'nin iki elektron indirgenmesi ile su oluşmakta, tek elektron indirgenmesi ile OH^{\cdot} radikali oluşmaktadır. Bu indirgenme demir, bakır gibi metal iyonları tarafından katalizlenmektedir. Radikaller arasında en aktif olandır. Yarılanma ömrü çok kısadır. Aminoasitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipidler ve karbonhidratlarla reaksiyona girebilmektedirler (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

İyonizan radyasyona bağılı olarak suyun hidroliziyle, Fenton Reaksiyonu sonucu veya Haber-Weiss Reaksiyonuyla açığa çıkabilmektedirler (Liochev ve Fridovich, 2002).



1.2.2.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksit radikallerinin, enzimatik veya non-enzimatik dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşmaktadır. Yapısında çiftleşmemiş elektron içermediğinden radikal özelliği taşımamaktadır. H_2O_2 'in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 , özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturmaktadır. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilmektedir. Biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 , önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır (Yurdakul, 2003; Genç, 2008).

1.2.2.4. Singlet Oksijen ($\text{O}_2\downarrow\uparrow$)

Singlet oksijenin eşleşmemiş elektronu yoktur o yüzden radikal olmayan reaktif oksijen molekülü olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana gelebildiği gibi, serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden

olabilmektedirler (Bekerecioğlu ve ark., 1998). Kuvvetli oksidan bir ajandır, birçok molekülle etkileşmektedirler. Membran lipitlerine etki ederek peroksitleri oluşturmaktadırlar (Noronha-Dutra ve ark., 1993).

1.2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri

Oksidanlar belirli düzeyin üzerinde oluşursa oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipit, karbonhidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar (Halliwell, 1991).

Artmış Reaktif Oksijen Partiküllerinin Zararları:

- Hücre organelleri ve membranındaki lipit ve protein yapısını bozarlar,
- Hücre içi yararlı enzimleri, proteinleri etkisizleştirirler,
- DNA'yı tahrip ederler,
- Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar,
- Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksisgenaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksisgenaz, triptofan dioksisgenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler,
- Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiol/disülfid oranını değiştirirler,
- Hücrenin potasyum kaybını arttırırlar,
- Trombosit agregasyonunu arttırırlar,
- Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar,
- Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar,
- Lipid peroksidasyonunu, zar yapısını ve fonksiyonunu değiştirirler,
- Zar proteinlerinin tahribini, taşıma sistemlerini bozarlar (Çavdar, 1997).

1.2.3.1. DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri

Reaktif oksijen türleri hücredeki çoğu yapı ve molekülleri etkilemektedir, hedef yapılarından en önemlisi DNA'dır. DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açabilmektedirler. Tek veya çift zincir DNA kırılmalarına, pürin ve pirimidinlerde modifikasyonlara, deoksiriboz-fosfat iskeletinde hasara, DNA-protein ve DNA-DNA çapraz bağlantılarına neden olabilmektedirler (Dizdaroğlu, 1991; Cooke ve ark., 2003).

Singlet oksijen guanini kolayca oksitleyebilmektedir. Guaninin, DNA'da en kolay oksitlenebilen baz olduğu bilinmektedir (Mori ve ark., 1998; Epe, 1992).

Hidroksil radikali DNA molekülünün bütün bileşenleri ile kolayca reaksiyona girebilmekte ve pürin, pirimidin bazlarına ve deoksiriboz iskeletine zarar vermektedir (Dizdaroğlu ve ark., 2002). Hidroksil radikali dört bazdan birçok ürün oluşturabilmektedir.

Hidrojen peroksit zarlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilmektedirler (Meram ve Aktaran, 2002; Özkan ve Fışkın 2004).

1.2.3.2. Proteinlere Etkileri

Amino asit yan zincirlerinin oksidasyonu, peptid ayrılmaları, lipit ve karbonhidrat oksidasyon ürünleri ile reaksiyona giren protein oksidasyon ürünleri sonucu protein karbonil türevleri oluşabilmektedir. Proteinlerdeki tüm aminoasit rezidülerinin yan zincirleri iyonize radyasyon ve ROT ile oluşan oksidasyondan çok çabuk etkilenmektedirler (Stadtman, 2004). En kolay etkilenen aminoasitler, sülfür veya selenyum içeren kalıntılardır. Proteinlerin prolin, histidin, arjinin, lizin ve sistein rezidüleri redoks metallere oksidasyona çok hassastırlar (Valko ve ark., 2006). Prolin ve lizin reaktif oksijen türleri üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında

nonenzimatik hidrosilasyona uğrayabilmektedirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olmaktadır (Altınışik, 2000).

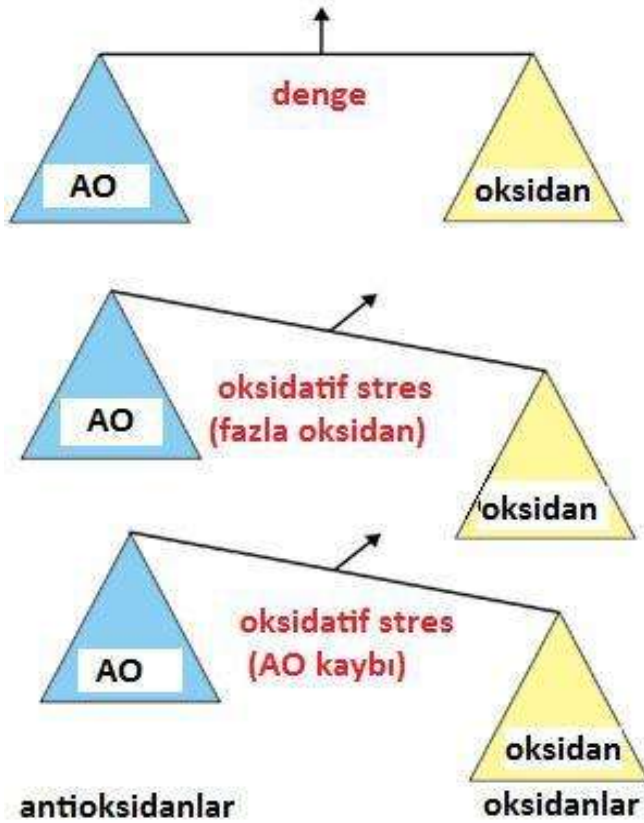
1.2.3.3. Lipitlere Etkileri

Biyolojik zarların yapısı lipit ve proteinden oluşmaktadır. Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Serbest radikallerin biyolojik dokulardaki doymamış yağ asitlerine etkileri lipit peroksidasyonu olarak bilinmektedir. Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, malondialdehit, etan ve pentan gibi ürünlere yıkılma tepkimelerine denilmektedir. Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonrasında açığa çıkan ürünler zar geçirgenliğini ve akışkanlığını ciddi şekilde etkileyip hücre ve organel içeriklerinin ayrılmasına neden olan kopma ve kırılmalara yol açmaktadır (Nyska ve Kohen, 2002). Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen zar hasarı geri dönüşümsüzdür (Gutteridge, 1995).

Zincir reaksiyonu şeklinde olan lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan radikal etkisiyle çoklu doymamış yağ asitleri üzerindeki metilen grubundan bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Oluşan lipit radikali oksijenle reaksiyona girerek lipit peroksil radikalini oluşturmaktadır. Lipit peroksil radikalinin de diğer doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girmesiyle zincirleme bir reaksiyon başlamış olmaktadır. Lipit peroksiller hidrojen atomları ile de reaksiyona girerek lipit hidroperoksidleri oluşturmaktadırlar (Young ve Woodside, 2001; Niki ve ark, 2005). Lipit peroksidasyonunun son bileşeni olan malondialdehit (MDA) peroksidasyona uğramış çoklu doymamış yağ asitlerinin bölünmesiyle oluşan üç karbonlu bir dialdehittir ve oksidatif durumun göstergesi olarak yaygın kullanılmaktadır. Lipitlerden araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipit peroksidasyonu”, diğer radikallerin sebep olduğu lipit

peroksidasyonuna ise “non-enzimatik lipit peroksidasyonu” denmektedir (Akkuş, 1995).

1.2.4. Antioksidan Savunma Sistemi



Şekil 1.3. Oksidatif stres

Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Böylece sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Reaktif oksijen türlerinin kimyasal veya metabolik oluşumuna yol açan hücre içi veya hücre dışı koşullar oksidatif stres olarak adlandırılır (Şekil 1.3). Oksidan ve antioksidan kapasite arasındaki denge organ veya organ sistemlerinin oksidatif strese olan duyarlılıklarını belirlemektedir (Serafini ve Del Rio, 2004).

Organizmada serbest radikal üretimi sürekli devam ettiğinden serbest radikallerin olumsuz etkilerine karşı birçok savunma sistemi gelişmiştir. Antioksidan; hücrelerde bulunan protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen, ROT'lar ile reaksiyona girerek organizmayı koruyan maddelerdir (Young ve Woodside, 2001).

Antioksidanlar enzimatik ve non enzimatik olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır (Mates ve ark., 1999).

1.2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar ve Etkileri

Sitokrom oksidaz sistemi: Hücrelerdeki O₂'nin %95-99'nun detoksifikasyonu

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit anyonunun detoksifikasyonu

Katalaz (CAT): Hidrojen peroksidin detoksifikasyonu

Glutatyon peroksidaz (GPx): Hidrojen peroksidin detoksifikasyonu

Glutatyon redüktaz: Okside glutatyonun indirgenmesi

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz: NADP'nin NADPH'a dönüşmesi

1.2.4.2. Nonenzimatik Antioksidanlar ve Etkileri

α -tokoferol (vit E): Zincir kırıcı

β -karoten (vit A): Radikal tutucu

Askorbik asit (vit C): •OH radikali tutucu

Glutatyon: Hücre içi sülfidril tamponu

Albümin: Hem ve bakır bağlayıcı

Seruloplazmin: Bakır bağlayıcı

Haptoglobulin: Hemoglobin bağlayıcı

Transferrin: Dolaşımdaki demir iyonlarını bağlayıcı

Ferritin: Dokudaki demir iyonlarını bağlayıcı

Hemopeksin: Hem bağlayıcı

Bilirubin: Peroksil radikali tutucu

Ürat: Radikal tutucu, metal iyonları bağlayıcı

Glukoz: •OH radikali tutucu

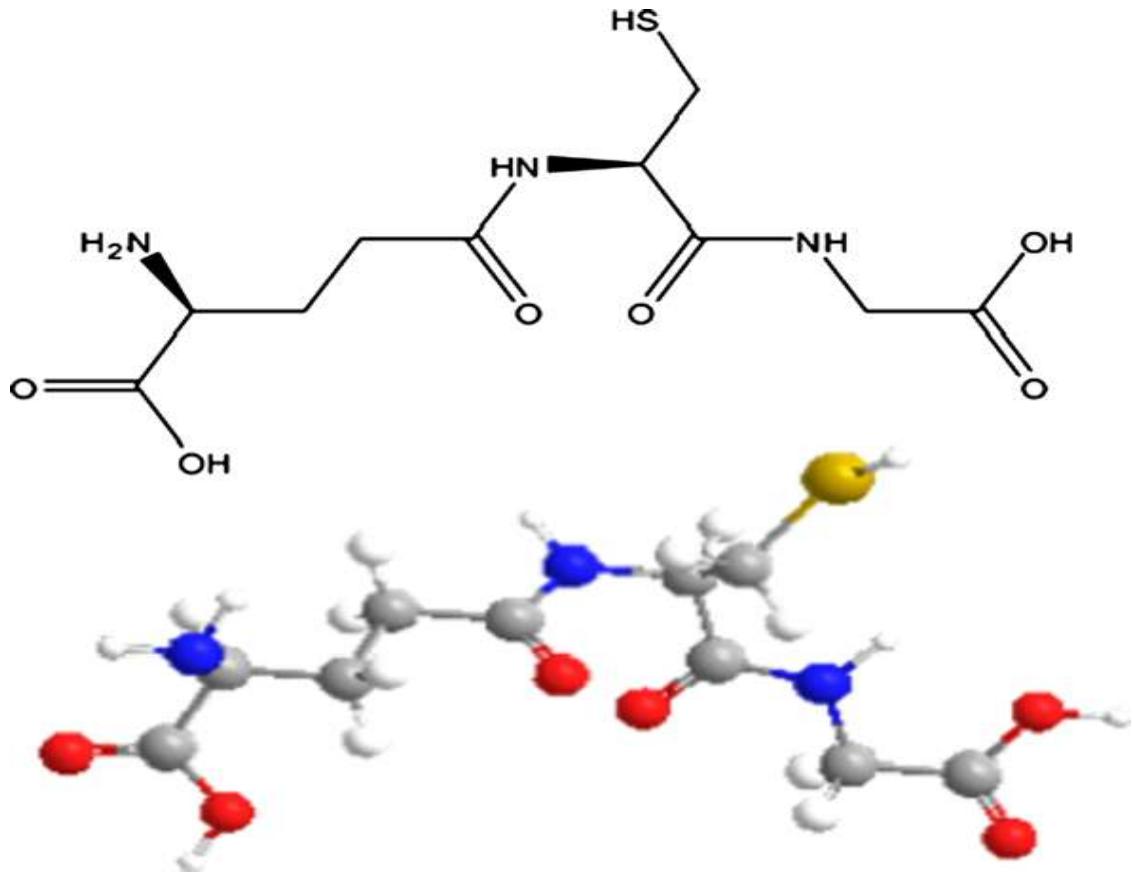
Sistein: Radikal tutucu

Koenzim Q: Antioksidanlarla etkileşebilir (Ünal, 2007).

Serbest radikallere karşı, hücrenin en önemli savunma aracı glutatyonudur. En toksik serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalının kaynağı olan H_2O_2 glutatyon peroksidaz ile suya yıkılırken; diğer organik hidroperoksitler alkollere redüklenmektedirler. Peroksidaz reaksiyonu sırasında oksitlenen glutatyon, glutatyon redüktaz ile tekrar redüklenmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

1.3. Glutatyon

Glutatyon (GSH); γ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin olarak bilinen bir tripeptittir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Glutatyonun moleküler yapısı

Mikroorganizmalardan insanlara kadar birçok hücrede sentezlenen, intrasellüler konsantrasyonda çok yüksek oranda bulunan, düşük molekül ağırlıklı, non-protein tiyol yapısında olan önemli bir antioksidandır (Meister and Anderson, 1983).

GSH konsantrasyonu insan eritrositlerinde 2 mM, hepatosit sitozollerde ise yaklaşık 10 mM'dır (Samiec ve ark., 2000). Hüresel glutatyonun % 85–90'ı sitozolde geri kalan kısmı ise mitokondri, nükleer matriks ve peroksizom gibi birçok organelde bulunmaktadır (Lu, 2000). Safra asidi salgısında GSH konsantrasyonu 10 mmol/L'ye kadar çıkarken, ekstrasellüler sıvıda (örneğin plazmada 2- 20 μ mol/L) düşük konsantrasyonda bulunmaktadır. Çünkü sisteinin varlığı ile GSH, elektrofilik maddeler (örn serbest radikaller, reaktif oksijen/nitrojen türleri) tarafından GSSG'ye okside olmaktadır. Sisteinde bulunan sülfidril grubu (-SH) en aktif gruptur, glutatyonun en önemli fonksiyonlarından sayılan redüksiyon ve konjugasyon reaksiyonlarına katılmaktadır. Bu reaksiyonlar birçok ksenobiyotik bileşiklerinin ve peroksidazların yok edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca GSH hücre siklusunun regülasyonuna da katılmaktadır (Meister, 1992).

Yetişkin bir insanda GSH üretiminin günde yaklaşık olarak 10 gram olduğu tahmin edilmektedir (Meister, 1995). Glutatyon bütün organlarda özellikle karaciğerde sentezlenen bir moleküldür. Memelilerin bütün dokularında bulunmaktadır (Vignais, 2002).

1.3.1. Glutatyonun Sentezi

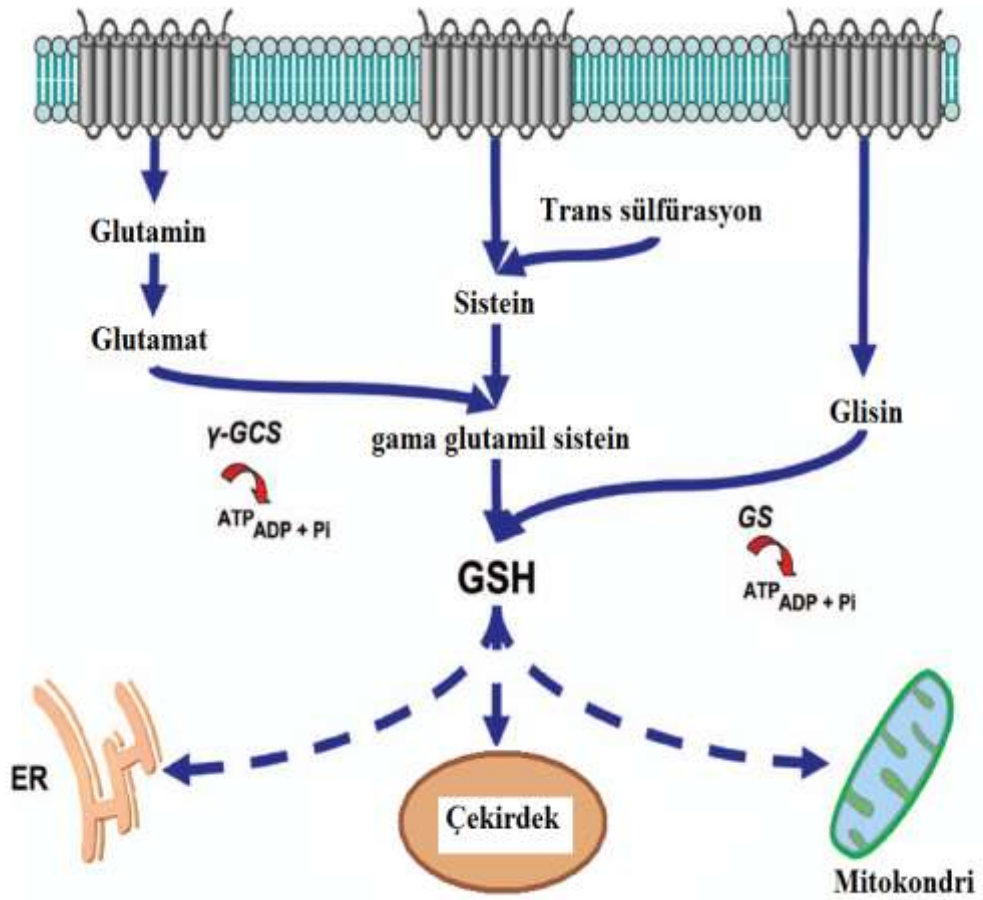
Glutatyon, ilk önce sisteinin glutamata eklenmesi sonra da oluşan bu yapıya glisinin ilavesiyle sentezlenmektedir. GSH, sitozol ve mitokondride bulunan iki sitozolik enzim tarafından ardı ardına katalize edilmektedir (Şekil 1.5).

Bu enzimler;

1. γ -glutamilsistein sentetaz (glutamat-sistein ligaz olarak da bilinir) tarafından L-glutamik asit ve L-sisteinden bir dipeptid olan γ -glutamilsistein oluşur.
2. Glutatyon sentetaz tarafından katalize edilir. γ -glutamilsistein'in C-terminal bölgesine glisin ilavesi ile GSH oluşur (Richman ve Meister, 1975).

Oluşan glutatyon gama glutamil transpeptidaz ile hücre dışına taşınmaktadır. Bu reaksiyonların tümüne birden gama glutamil siklusu denir (Huang ve ark., 1993).

Her iki basamakta ATP'ye ve Mg^{+2} 'ye ihtiyaç vardır.



Şekil 1.5. Glutatyon sentezi

Glutasyon kompetitif olarak gama glutamilsistein sentetazı inhibe eder ki bu nonallosterik feedback inhibisyonudur (Huang ve ark., 2002). GSH azaldığı zaman kısa bir süre içinde GSH sentezi artmaktadır. Bu mekanizma ile fazla GSH üretimi veya γ -glutamilsistein birikimi önlenmiş olur (Joseph ve Mannervik, 2006). GSH üretimi gerektiğinde enzim gen ekspresiyon aktivasyonu transkripsiyonel aracılığı ile indüklenmektedir. Oksidatif stres veya elektrofille maruziyet durumunda indüklenme görülmektedir. İndükleme hücrel sinyali kapsar, yani glutamat sistein ligaz genin antioksidant cevap elemanının aktive edilmesidir (Nguyen ve ark., 2003). İndükleme sonucu artan GSH toksik ve mutajenik hasara karşı hücrel savunmaya katılmaktadır.

γ -glutamilsistein'in glutasyona dönüşümünde bir hata meydana geldiğinde alternatif bir yol oluşmaktadır. Bu yol γ -glutamilsiklotransferaz tarafından katalizlenen γ -glutamilsistein 5-oksoprolin dönüşmesidir (Bridges ve Meister, 1985). Fazla 5-oksoprolin üretimi nadiren görülen kalımsal glutasyon sentetaz eksikliği hastalığında görülmektedir. Bu eksiklik oksoprolinuria, kronik metabolik asidoz ve nörolojik bozukluk olarak karakterize edilir. İnsanlarda glutasyon sentetaz eksikliği; proteinlerde mutasyon, katalitik fonksiyon kaybı veya enzim stabilitelelerinin bozulmasıyla oluşmaktadır (Njalsson ve ark., 2000). Glutasyon sentetaz enzim geninin tamamen yok olması ölüme yol açabilmektedir.

Gama glutamil transpeptidaz membran bağı transpeptidaz olup, glutasyonun hem kullanımında, hem de yıkımında rol oynamaktadır.

Enzim 3 tip reaksiyonu katalizlemektedir.

- a) Transpeptidasyon; gama glutamil kalıntısının bir akseptöre transferi
- b) Ototranspeptidasyon; gama glutamil kalıntısı GSH'a transfer ederek gama glutamil GSH oluşumunu sağlama.
- c) Hidroliz; alfa glutamil kalıntısının hidrolizi (Konukoğlu ve Akçay, 1995).

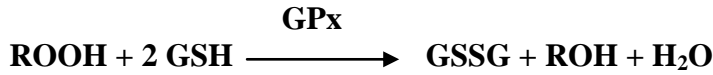
1.3.2. Glutasyon Metabolizması

Glutasyon dokularda birbiriyle denge halinde bulunan, indirgenmiş glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG) olmak üzere iki şekilde bulunur. İntrasellüler GSH, GSH peroksidaz tarafından okside glutasyona (GSSG) dönüştürülmektedir. Hücrede total GSH'ın %5'inden daha azı okside formda bulunmaktadır (Reed, 2000). GSSG hayvansal hücrede protein sentezini inhibe edebilmektedir. GSSG'nin bu etkisi hücrede intrasellüler GSSG düzeylerinin neden normalden çok düşük olduğunu ve eritrositlerden, karaciğer ve kalp gibi organlardan plazmaya neden GSSG salındığını açıklamaktadır. Hücre içi GSH içeriğinin farklı durumlarla değiştiği bilinmektedir. Glutasyon S transferaz ile konjugasyon reaksiyonları ile GPx'in aktivitesi ile ve H₂O₂ üretiminin artmasıyla GSSG oluşumu ve GSH miktarı azalmaktadır (Dickinson ve Forman, 2002).

1.3.2.1. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz, peroksitlerin redüksiyonunu katalizleyen, selenosistein şeklinde bir atom selenyum (Se) içeren, tetramer yapıda bir metalloproteindir. GPx, başta karaciğer olmak üzere, eritrositler, kalp, akciğer, böbrek, göz, beyin ve plasenta gibi dokularda bulunmaktadır. Enzimin subsellüler olarak, en çok sitozolde ve mitokondriyal matrikste lokalize olduğu bilinmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Mitokondrilerde oluşan veya endoplazmik retikulumdan sitoplazmaya salgılanan ya da SOD gibi sitozolik enzimlerle açığa çıkan H₂O₂, GSH varlığında, GPx ile suya redüklenmektedir, ayrıca steroid hidroperoksitler, yağ asidi hidroperoksitleri ve lipid peroksi radikalleri gibi diğer birçok organik hidroperoksidi (ROOH'yi) alkollere indirgeyerek hücreleri bu moleküllerin oksidatif hasarından korur (Kumaragrupan ve ark., 2002).





Her iki reaksiyonda da, GSH, enzimin aktif bölgesinde bulunan selenyumu redüklemekte ve peroksitler, enzimin bu redükte formu ile redüklenmektedir. Daha sonra reaksiyona katılan ikinci GSH ile enzim aktif formuna dönerken; GSH, disülfid formu (GSSG)'na oksitlenmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Glutatyon peroksidazın substrat spesifikliğine bağlı olarak iki tipi tanımlanmıştır.

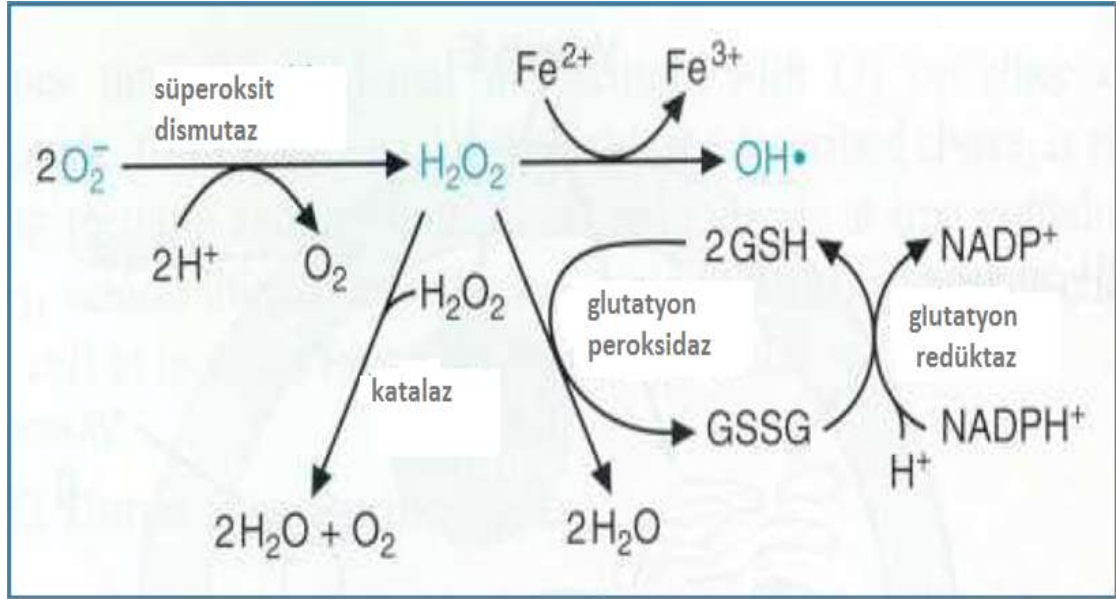
a) Selenyum bağımsız GPx'in etkisi hidrojen peroksid dışındaki organik hidroperoksitler üzerinedir (Lawrence ve Burk, 1976).

b) Selenyum bağımlı enzim ise ayrıca hidrojen peroksid üzerine etkilidir (Eritrositlerde GSH ve GSH peroksidaz varlığında) H_2O_2 'nin redüksiyonu; GSSG redüktaz aktivitesi için gerekli olan NADPH'ları sağlayan pentoz fosfat yoluyla ilişkilidir (Mulder ve ark., 1995). Bu önemli reaksiyonlar membran lipidlerini oksidasyona karşı korumaktadır.

GSH peroksidaz, aynı zamanda prostaglandinlerin sentezinde ve prostasiklin oluşumunun regülasyonunda da fonksiyon görmektedir ve bu fonksiyonu da prostaglandin H sentetaz aktivitesini düzenleyerek yapmaktadır (Cnubben ve ark., 2001).

1.3.2.2. Glutatyon Redüktaz

Okside glutatyon, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)-bağımlı bir enzim olan glutatyon redüktaz tarafından redükte glutatyon'a indirgenirken NADPH_2 ise NADP^{+} 'e dönüşmekte ve ilgili tepkimelerde kullanılmaktadır (Camera ve Picardo, 2002). Glutatyonun %95'ten fazlası indirgenmiş formda bulunur. Bu formda tutunabilmesi pentoz fosfat metabolik yoluna bağlıdır. Bu yolda üretilen NADPH, glutatyon disülfid redüktaz (GR)'ın katalize ettiği reaksiyonlarda koenzim olarak görev almaktadır (Mates ve ark., 1999) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Glutasyon redoks siklusu

1.3.2.3. Glutasyon-S-Transferaz

Glutasyon-S-Transferazlar (GST'ler) karsinojen ve mutajenleri içeren çeşitli hidrofobik ve elektrofilik substratların glutasyonun tiol (-SH) grubu ile konjugasyonunu sağlayan çok işlevli bir enzim grubudur (Ketterer, 1986). GST'ler elektrofilik substratlar üzerine GSH'nin nükleofilik atağını katalizleyerek, GSH'nin SH grubu ile ilgili bileşiklerin elektrofilik bölgelerini nötralize ederek bunların hücrel makromoleküller üzerine olan reaktifliklerini azaltmaktadırlar. GST'ler bitki, hayvan ve bakterileri kapsayan hemen tüm canlı türlerinde bulunmaktadır. GST'nin peroksidaz aktivitesi selenyum bağımlı değildir, fakat GSH'a gereksinim duymaktadır. Küçük bir mikrozomal GST ailesi ve GST kapp olarak tanımlanan mitokondriyal bir GST dışında GST'lerin büyük kısmı çözünebilir enzimlerdir. Farklı GST formları çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. GST enzimleri primer yapılarına, substrat spesifitelerine, kimyasal afinitelerine, aminoasit dizinlerine ve kinetik davranışlarına göre 8 sınıfta gruplandırılırlar: alfa (α), mü (μ), pi (π), sigma (σ), teta (θ), kappa (κ), zeta (ζ) ve omega (ω).

Tepkime iki basamak halinde yürümektedir. Birinci basamakta hidroksillenmiş GSH'nın üretimi ile peroksit alkole enzimatik olarak indirgenir. İkinci basamakta spontane tepkimeyle hidroksillenmiş GSH, bir molekül GSH ile sonuçta GSSG ve su açığa çıkartmaktadır. Çok sayıda kimyasal GST'ler için substrat olabilmektedirler. Bunun nedeni non-spesifik hidrofobik substrat bağlanma bölgesinin varlığı ve çok sayıda izoenzimin bulunmasıdır. Böylece GST karsinogenik bileşikleri, çevresel kirleticileri, ilaçları ve diğer birçok bileşiği substrat olarak kullanmaktadır. Substratların elektrofilik fonksiyonel merkezleri karbon, nitrojen veya sülfür olabilmektedir. Elektrofilik bileşik ve GSH'nın sistein rezidüsü arasında GST tarafından katalizlenen tiyoeter bağının oluşumu genellikle suda daha çok çözünebilen ve daha az reaktif olan ürünler oluşturur. Bu nedenle GST reaksiyonları genellikle detoksifikasyon reaksiyonlarıdır.

Enzimin fonksiyonu proteinin aktif merkezinde hem GSH hem de elektrofilik substratın bağlanması ile GSH ile substratın yaklaşmasını sağlamak ve GSH üzerindeki sülfidril grubunu aktive ederek elektrofilik substrat üzerine GSH'nın nükleofilik atağını sağlamakla görevlidir (Eaton ve Bammler, 1999).

Glutatyon S-transferazlar suda çözünen ve idrarla atılan merkaptürik asit (N-asetilsistein) biyosentezinin başlangıç reaksiyonlarına aracılık etmektedirler. Merkaptürik asit biyosentezi başlangıçta GSH konjugatı ile başlayan ve sonra γ -glutamil transpeptidaz tarafından glutamik asitin uzaklaştırılması ile sonuçlanan, sisteinil-glisin konjugatının oluşumu ile devam eden birkaç basamaktan oluşmaktadır. Bu reaksiyonu glisininin uzaklaştırılması ile sisteinil S-konjugatının yani pre-merkaptürik asitin oluşumu izler. N-asetiltransferazlar tarafından sisteinil S-konjugatının asetilasyonu-merkaptürik asit oluşumu ile sonuçlanır.

Son 20 yıl süresince plasenta içerisinde ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunun nasıl gerçekleştiği üzerine bir takım kabul edilebilir teoriler geliştirilmiştir: Bir metabolik bariyerin yabancı yapıları fetusa ulaşmadan engellediği ya da toksik metabolitler için basit bir enzim sistemi bulunduğu düşünülmektedir. Bu sistem içerisinde P-450 enzim grubu ve diğer monooksijenazlar yanında GST yer

almaktadır (Pasanen ve Pelkonen, 1994). Dolayısıyla GST'lerin çeşitli özellikleri ve özgüllüğünün saptanması büyük önem taşımaktadır.

1.3.3. Hücrelerde Glutatyonun Varlığı ve Fonksiyonları

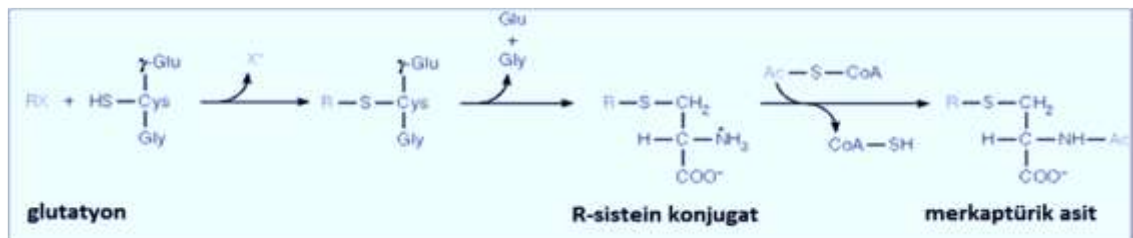
Tiyoredoksin ve GSH gibi düşük moleküler ağırlıklı, sülfür içeren bileşikler, yani tiyoller kolaylıkla okside edilebilir ve hızlı bir şekilde rejenere edilebilmektedirler. Bu özellikleri bu bileşiklerin birçok biyokimyasal ve farmakolojik reaksiyonda önemli bir rol oynamalarını sağlamaktadır (Reed, 2000). Hücrelerde total glutatyon serbest veya proteinlere bağlı olarak bulunmaktadır. Serbest glutatyon redükte halde bulunmakta, oksidatif stres durumunda okside hale geçmektedir ve sonra tekrar glutatyon redüktaz enzimi tarafından redükte hale dönmektedir. Redoks durum glutatyonun redükte ve okside formlarının (GSH/GSSG) rölatif miktarlarına bağlıdır, bu durum hücre için kritik bir bulgudur. Dinlenme halindeyken hücredeki GSH/GSSG oranı 100'ü aşmış durumdayken oksidatif strese maruziyet durumunda bu oran 1 ile 10 arasına düşmektedir (Chai ve ark., 1994; Pastore ve ark., 2003).

Oksidatif stres ve serbest radikal patolojilerini kapsayan araştırmaların merkezinde glutatyonun okside/redükte durumu yer almaktadır. Araştırmalar glutatyon reaksiyonlarının birçok hastalığın fizyopatolojisinde rol oynadığını desteklemektedir (Rossi ve ark., 2002). Çeşitli hastalığı olan insanlarda düşük glutatyon ve yüksek GSSG/GSH oranı bulunmaktadır. Örneğin akciğer hastalıklarında intrasellüler ve ekstrasellüler GSH düşüklüğünden kaynaklanan patolojilere dair çalışmalar (Biswas ve Rahman, 2009), karaciğerde GSH transferi ve metabolizması üzerine yapılan çalışmalar (Yuan ve Kaplowitz, 2009) ve viral hastalıklardaki patolojilerin GSH ile ilişkisine (Fraternali ve ark., 2009) dair çalışmalar yer almaktadır. Bunun dışında HIV enfeksiyonu, siroz, solunum hastalıkları, gastrointestinal ve pankreatik inflamasyon, diyabet, sinirsel hastalıklar, yaşlanma, preeklampsi, erken doğum, intrauterin gelişme geriliği gibi hastalıkların patogenezinde ve ilerlemesinde glutatyonun önemli rolü olduğu kanıtlanmıştır (Wu ve ark., 2004).

Glutatyonun derişimi, sentezinde kullanılan substratlarının teminine ve sentezinde görev alan enzimlerin derişimine bağıdır. Hücreler glutamat ve glisinden zengindir fakat sistein sınırlı miktarda bulunmaktadır. Bazı hücrelerde sistein oluşumu sistetiyonin yolunda serin aminoasidinin metiyonin tarafından transsülfürasyonu ile başılır. Sistein aynı zamanda doku proteinlerinin yıkımından ve diyetle alınan proteinlerden de gelmektedir. Bu şartlar altında iki sentetazın substratlarının derişiminin artmasıyla glutatyon sentezi artmaktadır (Griffith, 1999; Wu ve ark., 2004).

Glutatyonda iki önemli yapı mevcuttur, bunlar γ -glutamil köprüsü ve sülfidril grubudur. Tripeptidin bu parçaları GSH'ın çeşitli ve çok sayıda fonksiyona katılımını kolaylaştırmaktadır. Glutatyon, sülfidril grubu taşıyan moleküllerin örneğın ko enzim A, çeşitli enzimler ve proteinlerin oluşumunu ve devamını kapsayan transhidrojenasyon reaksiyonlarına katılmaktadır. Glutatyon, dehidroaskorbata askorbata redüksiyonu, ribonükleotid redüktaz tarafından deoksoribonükleotidlerin oluşumu gibi birçok reaksiyonlar için redükleme kapasitesi sağlamaktadır.

Glutatyon hidrojen peroksit, diğer peroksitler ve serbest radikallerin detoksifikasyonunda görev almaktadır. Ayrıca glutatyon ile etkileşime giren ve idrar-feçesten merkaptürik asit formunda atılan çok çeşitli ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynamaktadır (Pastore ve ark., 2003) (Şekil 1.7). Hücre içi bakır transportunda da işlev görür, GSH bakır iyonları ile şelatlar oluşturur ve bunların serbest radikal oluşturma kapasitelerini azaltır.



Şekil 1.7. Glutatyon ile etkileşime giren ve idrar-feçesten merkaptürik asit formunda atılan ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu

Glutasyon, oksidatif strese karşı temel koruyucu mekanizmanın bir parçasıdır. Glutasyon hücreleri metabolik strese karşı iki farklı yolla korumaktadır:

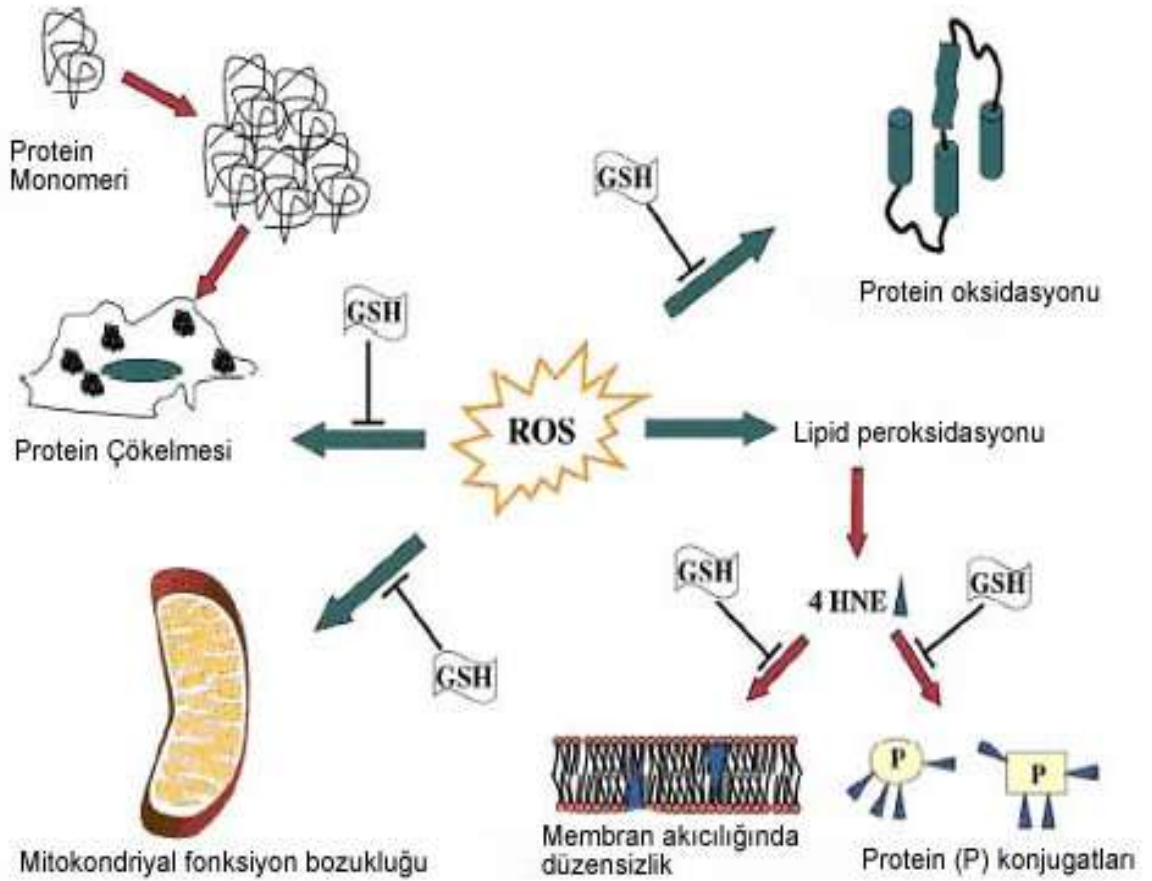
1) Oksitleyici koşullarda hücrede biriken peroksitler veya serbest radikaller gibi bileşikler enzimatik olmayan bir yolla azaltır. Hücrede indirgen bir ortam yarattığından hücre içi proteinlerdeki tiyol gruplarının oksitlenerek disülfit bağları oluşturmasını engellemektedir.

2) Glutasyon-S-Transferaz ile birlikte organik halojenürlerin, lipid oksidasyonu sonucu oluşan yağ asidi peroksitlerinin ve radyasyondan zarar görmüş DNA'nın ürünlerinin detoksifikasyonunda görev almaktadır.

Oksidatif ve elektrofilik kimyasallara karşı hücresel hedefleri koruyarak koruyuculuk görevini yerine getirmektedir. Diğer hücresel görevi ise, deoksiribonukleotidlerin biyosentezinde redükleyici kofaktör gibi hizmet etmektir. GSH ayrıca değişik hücresel bölümlerde moleküler işlevlerin redoks regülasyonuna katılmaktadır (Forman ve ark., 2004). Nitrik oksit ve eikosanoid gibi sinyal moleküllerin taşıyıcısıdır (Napoli ve Ignarro, 2003; Murphy ve Zarini, 2002).

γ -glutamil siklus reaksiyonuyla glutasyon sentezi ve degradasyonu meydana gelmektedir. Glutasyonun santral sinir sisteminde önemli rolü vardır; γ -glutamil siklus defektinin varlığı; beyin defekti oluşması, zihinsel aksaklıklar gibi durumlar oluşturmaktadır (Meister A, Larsson, 1989; Pastore ve ark., 2003). Glutasyon sadece hücreleri oksidatif hasardan korumakla görevli değildir aynı zamanda proteinlerin normal fonksiyonları için gerekli olan sülfidril gruplarının redükte halde kalmasına olanak sağlamaktadırlar. GSH, protein agregatlarının oluşumuna karşı, kompleks I aktivitesinin inhibisyonu ile mitokondriyal düzensizliklerden, protein oksidasyonu ve 4-hidroksinonenal yan ürünlü lipid peroksidasyonuna karşı hücreleri korumaktadırlar (Şekil 1.8) (Bharath ve ark., 2002). Hücre GSH içeriğini koruyamadığı zaman geri dönüşümsüz hücre hasarı olabilmektedir (Reed ve Fariss, 1994).

Bu nedenle biyolojik örneklerde çeşitli glutatyon formlarının konsantrasyonunu ölçmek hastalıkta ve sağlıklıdaki glutatyon dengesini anlamamız için önemlidir.



Şekil 1.8. Oksidatif strese korunmada GSH'nin antioksidant fonksiyonlarının şematik gösterimi

GSH birçok hücre elemanında farklı görevlerde bulunmaktadır. Mitokondride nekroze karşı apoptosis regulasyonunda, çekirdekte hücre bölünmesinin regulasyonunda kilit rol oynamaktadır (Forman ve ark., 2009).

Glutatyonun fizyolojik rolü çok çeşitlidir. Aminoasit transportu, protein nükleik asit sentezi, enzimlerin aktif formda kalmasını sürdürmeleri, radyasyon ve endotoksin maruziyetinden koruma, septik ve kardiyojenik şokun iyileşmesi gibi çok sayıda hücre fonksiyonla ilişkili bulunmaktadır (Pastore ve ark., 2003).

Antioksidatif kapasitenin tespitinde GSH/GSSG oranı major redoks çift olmasına rağmen diğer redoks çiftleri de (NADPH/NADP⁺ ve tiyoredoksin red/tiyoredoksin oks) antioksidatif kapasitenin değerini etkilemektedir (Jones, 2002).

1.3.3.1. Hücrede Glutasyon Düzeyinin Azalması

GSH-ksenobiyotik konjugatlarının oluşması sitosolik GSH düzeylerini azaltmakta ve membran bütünlüğünün kaybı, lipid peroksidasyonu ve artan GSSG düzeyleri ile belirlenen oksidatif strese artışlara neden olmaktadır (Reed, 2000).

Dokularda GSH düzeylerini azaltan faktörleri 3 grupta toplamak mümkündür:

- 1) Sınırlı GSH sentezi
- 2) GSH kullanımındaki artış
- 3) İntrasellüler GSSG redüksiyonundaki azalma

Hücresele GSH düzeyleri oksidatif strese karşı oldukça duyarlıdır. Bu nedenle ROT ve nitrojen türlerinin etkisinde hücresele GSH düzeyleri hızla azalmaktadır. GSH'ın GSSG'ye oksidasyonu bu nedenle oksidatif stresin erken bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

Glutasyon kullanımındaki diğer önemli bir yol ilaçların ve çevresel kirleticiler gibi ksenobiyotiklerin metabolizmasıdır.

GSSG'nin GSH'a indirgenmesi hücre içinde GR tarafından katalizlenmektedir. GR mitokondriyal matrikste ve sitosolde yer almaktadır. GR aktivitesi kofaktör olarak eşdeğer miktarda NADPH'ye gereksinim duymaktadır. Hücrede NADPH üretimini sınırlayan faktörler GSSG'nin GSH'a indirgenmesinde düzensizlikler yaratır ve GSSG akümülyasyonuna neden olur. Akümüle olan GSSG hücrelerden dışarı atılır. GSSG'nin hücre dışına atılmasının bir sonucu olarak hücrede GSH rejenerasyonu için gereken substratların oranı belirgin bir şekilde azalır. Hücresele NADPH stoklarını azaltan koşullar glukoz metabolizmasındaki düzensizlikler ve oksidatif

stres gibi olaylardır. Oksidatif stres durumunda NADPH'nin hızla okside olduğu bilinmektedir.

Hücre içindeki GSH sentezi GSH düzeyinin kendisi tarafından düzenlemektir. Bu nedenle intrasellüler GSH düzeyleri GSH oranı için bir sınır faktörü olarak tanımlanmaktadır. İntrasellüler GSH düzeyini sınırlayan en genel faktör γ -glutamilsisteinin aktivitesini sınırlayan substrat olan sisteinin kullanılabilirliğidir. Sistein indirgenmiş formunda stabil değildir. Bu nedenle insanda dolaşımında ve hücre kültürlerinde büyük oranda sistin formunda bulunmaktadır (Sen, 1997). Hücresel GSH düzeyleri γ -glutamilsisteinin inhibe edilmesi ve bununla birlikte GSH kullanımını arttıran reaksiyonların birlikte kullanılması ile azaltılabilmektedir. Bu modelde GSH'ın azalma oranı GSH'ın kullanımına bağlı olarak ve dokudan dokuya farklılık göstermektedir.

1.3.3.2. Hücrede Glutasyon Düzeyinin Arttırılması

Hücresel GSH düzeylerinin arttırılması GSH düzeylerinin azaldığı koşullarda yararlı olabilmektedir. Hücre GSH düzeylerinin arttırılması iki şekilde başarılabilmektedir:

- a) Hücrelere ekzojen olarak sentezlenen GSH'ın doğrudan ulaştırılması ile
- b) GSH sentezinin artırılması ile.

Hücresel GSH depolarının direkt olarak arttırılması GSH esterleri uygulanarak da başarılabılır. GSH monoglisil ester ve GSH dietil ester gibi GSH esterleri bu amaçla kullanılmaktadır. GSH hidrofildir ve membranlardan geçemez. Fakat GSH esterleri lipofildir ve membranlardan geçebilirler.

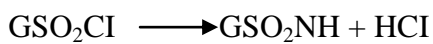
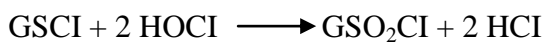
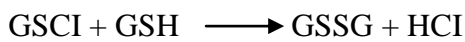
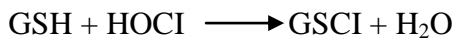
1.3.4. Glutasyon Analiz Metotları

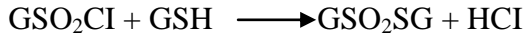
Glutasyon çeşitli yöntemlerle çeşitli biyolojik matrislerde ölçülmektedir (Pastore ve ark., 2003).

1. Spektrofotometrik metot
2. Florometrik metot
3. Biyoluminesens metot
4. Kapiler elektroforez
5. HPLC metot
 - a. HPLC ve elektrokimyasal ölçüm
 - b. HPLC ve ultraviyole ölçüm
 - c. HPLC ve flurometrik ölçüm
6. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
7. Nükleer manyetik rezonans
8. Kan ve plazmadaki referans değerler

1.3.4.1. Spektrofotometrik Yöntem

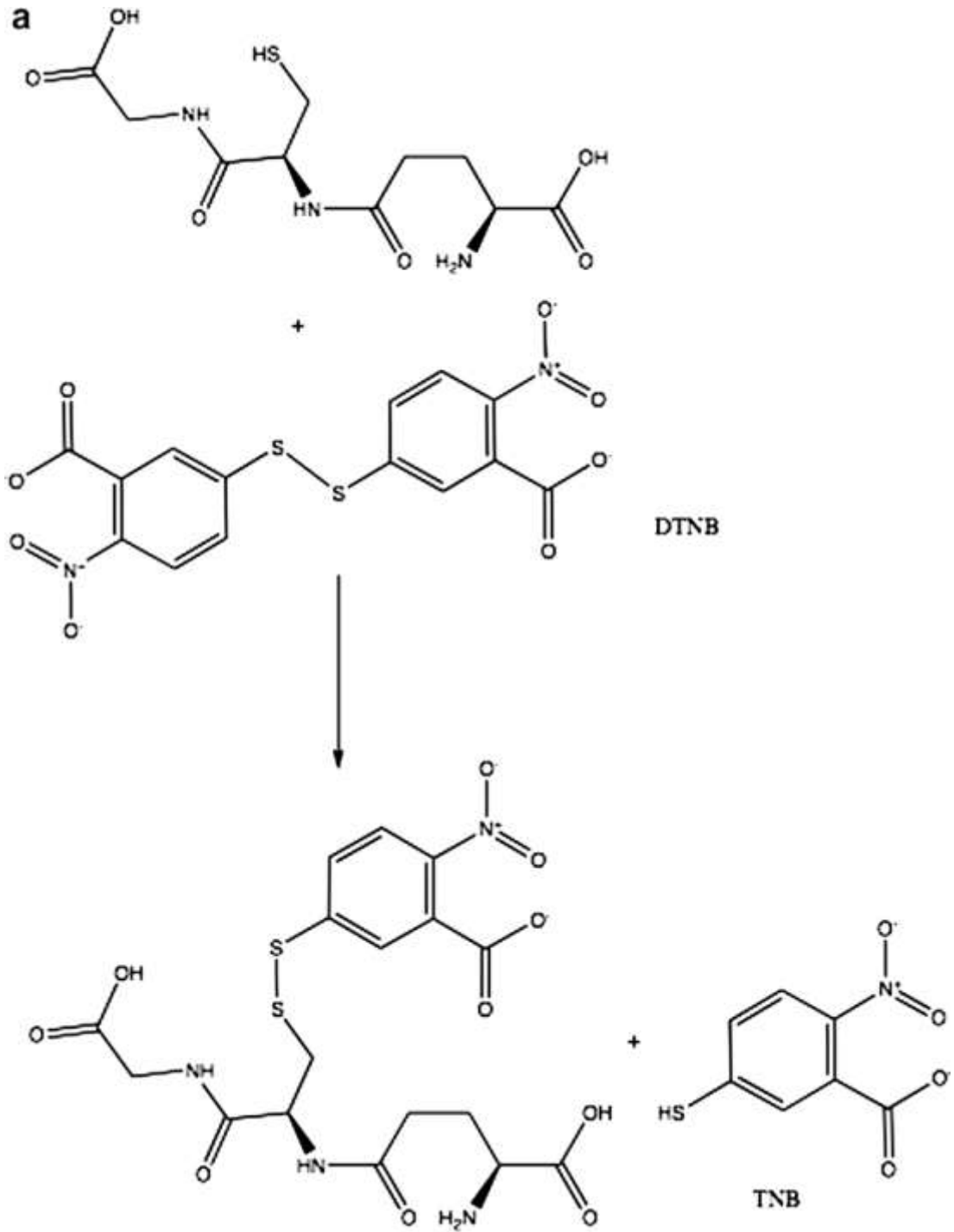
Sigara içen yada partikül/oksidanları inhale edenlerde endotel ve epitel hücrelere doğru kandan nötrofillerin invazyonuna sebep olan potansiyel inflamasyon daha sık görülmektedir. Bu nötrofiller, hücrelerin arasına sızarak HOCl'i (hipoklorik asit) serbest bırakırlar, serbest kalan HOCl, epitel hücreyi koruyan ve epitel hücreden salgılanan GSH ile reaksiyona girerler (Venglarik ve ark., 2003).





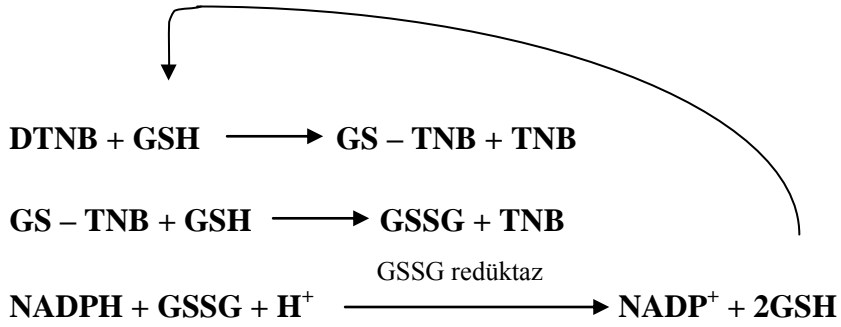
Nitrojen dioksit ve H_2O_2 gibi çok fazla toksik içeren sigarayı kullananlarda hem kronik inflamasyon hem de normalden daha düşük seviyede GSH gözlenmektedir (Roum ve ark., 1993). Epitel hücrelerin dış yüzeyinde veya akciğerin lining sıvısındaki proteinleri HOCl okside etmektedir. HOCl ayrıca lipitlerle reaksiyona girip lipit peroksidasyonla çok daha tehlikeli bileşikler oluşturmaktadırlar (Pullar ve ark., 2000). Yukarıdaki reaksiyonlar GSH ile HOCl'nin nasıl reaksiyona girdiğini ve GSH'ı nasıl yok ettiğini göstermektedir (Winterbourn ve Brennan, 1997). Akciğerlerde ve diğer organlarda GSH düzeyinin nasıl azaldığına dair çalışmalar yürütülmektedir.

Oksidatif stres ve redoks sinyal oluşum mekenizmasını belirlemede hücrelerde tiyollerin değişik formlarının ölçümü önemli bir çıkış noktasıdır (Forman ve ark., 2009). GSH, DTNB (ditiyonitrobenzoik asit) (Akerboom ve Sies, 1981) ile reaksiyona girer ve GSSG'nin indirgenmesiyle total GSH ölçülmüş olur. DTNB'nin GSH ile reaksiyona girmesiyle bir konjugat oluşur ve TNB (tiyonitrobenzoik asit) anyonu floresans veya absorbansla tespit edilir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Glutasyon ile DTNB reaksiyonu

Total glutasyonu ölçmek için, GSH'ın GSSG ve diğer TNB gibi floresans veya absorbansı arttıran molekülleri üreten konjugat ile reaksiyona girdiği geri dönüşüm methodu kullanılmaktadır. Glutasyon redüktaz enzimi ile GSSG redüklenir ve oluşan GSH tekrar DTNB molekülü ile reaksiyona girmektedir (Forman ve ark., 2009).



1.4. Sigara

Tütün, Amerika ve Avustralya kökenli olup hemen hemen her ülkede yetiştirilmektedir. *Nicotiana tabacum* denilen boyu yaklaşık 1,5 metrelik bir yıllık otsu bir bitkidir. Tütünün değişik kullanım biçimleri mevcuttur. Günümüzde tütünün en yaygın tüketim biçimi sigaradır.

Sigara içimi dünyadaki en önemli sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından sigara kullanımı, günümüzde bir biyososyo-psikolojik zehirlenme hali olarak tarif edilmektedir (Marakoğlu ve ark., 2006). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2003 yılındaki verilerine göre dünyada 1,3 milyar kişi sigara içmektedir. Yılda 4,9 milyon kişi ve her 8 saniyede bir kişi sigaradan kaynaklanan bir hastalıktan hayatını kaybetmektedir. Gerekli önlemler alınmaz ise 2020 yılında 10 milyon kişinin sigaradan kaynaklanan bir hastalıktan hayatını kaybedeceği ve bunun da 7 milyonunun gelişmekte olan ülkelerde olacağı tahmin edilmektedir (Dempsey ve Benowitz, 2001; Mackay ve Eriksen, 2002).

Türkiye kişi başına sigara tüketimi yönünden Avrupa ülkeleri arasında Yunanistan'dan sonra ikinci sırada (Aşut, 1993), dünya tütün üretiminde ise beşinci sırada yer almaktadır (WHO, 1997). Sağlık Bakanlığının son verilerine göre Türkiye genelinde 26 milyon civarında sigara içicisi bulunmaktadır. Bunun 22 milyonunu 19 yaş ve üzerindeki kişiler, 4 milyonunu ise 13-19 yaş arasında gençler ve çocuklar oluşturmaktadır. Ülkemizde erkeklerin %60-65'i, kadınların ise %20-24'u sigara içmektedir (Fisher ve Rost, 1996; Özşeker ve ark., 2004).

1.4.1. Sigaranın İçeriği

Sigara dumanının bileşimi, kullanılan tütünün tipine, sigaranın gevşek ya da sıkı sarılmış olmasına, içiliş tarzı ve tekniğine (içişin hızı, derinliği ve sıklığı) göre değişebilmektedir (Özyardımcı, 2002 ve Haroun ve ark., 2004). Sigaranın gaz ve buhar haline gelmiş dumanında; karsinojenik, mutajenik, sitotoksik, büyüme geriliği yapan, immünosüpresif etki gösteren pek çok madde bulunmaktadır (Fowler ve ark., 2007).

Sigara dumanı, tütün yandığı zaman oluşan yanma ve distilasyon ürünlerinin karmaşık bir birleşimidir. Sigara içen kişinin dışarıya üflediği hava “ana duman” olup yüksek ısıda oluşur (950°C) ve içen kişi için duman maruziyetinin temel kaynağıdır. “Yan duman” ise sigaranın içe çekişler arasındaki bekleme süresinde tüten duman olup daha düşük ısıdadır (350°C) ve çevresel sigara dumanının başlıca kaynağıdır (Postmus, 1998).

Ana akım sigara dumanı nikotin, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, siyanür, karbonmonoksit, kurşun, kadmiyum başta olmak üzere 4000’den fazla toksik maddenin karışımından oluşmaktadır (Haroun ve ark., 2004). Ana akım dumanında bulunan maddelerin 40 kadarı bilinen veya şüpheli karsinojendir (Özyardımcı, 2002). Ana akım dumanındaki gaz fazı bileşiklerinden bazıları; karbon monoksit, karbon dioksit, azot oksitleri, uçucu nitroz aminler, hidrojen siyanür, kükürt içeren uçucu bileşikler, alkoller, aldehit ketonlar (örneğin; asetaldehit, formaldehit ve akrolein) olarak sayılabilmektedir. Ana akım dumanının tanecikli bölümü de; katran, nikotin ve nemden oluşmaktadır. Ana akım dumanının bu kimyasal kompozisyonu yan akımından daha yoğun bir yapıdadır fakat her ikisi de aynı ana süreç tarafından üretilir ve birçok kimyasal bileşim her ikisinde de bulunmaktadır.

Nikotin, tütünün en karakteristik komponentidir. Çok toksik bir alkaloiddir. Yağda çözünen bir molekül olup yarılanma ömrü bir iki saattir. pH’ya bağlı olarak biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilmektedir.

Sigara dumanında belirlenen majör karsinojenler polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve nitrozaminlerdir (Holbrook, 1991).

Sigara içimi sırasında çok sayıda serbest radikal ve reaktif oksijen örnekleri üretilmektedir. Serbest radikaller hücrelerde membran lipitleri, proteinler, karbonhidratlar ve DNA üzerine çok sayıda farklı moleküller yoluyla oksidatif hasara neden olmaktadır. Sigara içimi ile artan oksidatif stres sonucunda makrofajlarda apoptozisin arttığı ve bu apoptozisin glutatyon, askorbik asit ve alfa-tokoferol gibi anti-oksidanlar tarafından inhibe edildiği bildirilmektedir (Aoshiba ve ark., 2001).

1.4.1.1. 1-Hidroksi Piren

Polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'lar iki veya daha fazla benzen halkasından oluşan, kimyasal olarak kararlı, uçucu özelliği az olan ve suda çözünürlüğü düşük yağda çözünürlükleri çok yüksek olan, organik maddelerin tam yanmaması sonucu oluşan geniş bir organik bileşikler grubudur. Endüstriyel işlemler, otomobil eksozları, fosil kaynaklı yakıtların yakılması, sigara dumanı, orman yangınları sonucu havaya yayılabilmektedirler veya ev atıkları, endüstriyel atıklar, petrol sızıntıları sonucu toprağa karışıp çevrede yaygın bir şekilde bulunmaktadır.

PAH alımı inhalasyon, deri ya da gastrointestinal yolla olmaktadır. Vücuda absorbe olan PAH monohidroksilatlarına (OHPAH) metabolize olmaktadır ve ikinci faz enzimleri aracılığı ile glukuronik asit veya sülfat konjugatlarına metabolize olmaktadır ve OHPAH konjugatları idrar veya safradan atılmaktadırlar (Chetianukornkul ve ark., 2006).

Önemli PAH bileşiklerinden biri olan benzo[a]piren Uluslar Arası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yüksek riskli karsinojen sınıfına alınmıştır (IARC, 1983).

PAH maruziyetinin belirlenmesinde kullanılan birçok biyolojik indikatör olmakla birlikte en çok kullanılan, kabul görmüş indikatör 1 hidroksi piren (1-OHP)'dir (Wang ve ark., 2002). Karsinojenik olmayan piren metabolizması sonucu 1-OHP oluşmaktadır (Breznicki ve ark., 1997), 1-OHP-glukuronid konjugasyonu şeklinde idrarla atılmaktadır. İnhalasyonu takiben, 1-OHP'nin yarı ömrü yaklaşık 18 ila 20 saattir (Jongeneelen ve Bos, 1990; Van Schooten ve ark., 1995). Faz I reaksiyonları ile oksidasyona veya hidrolize uğrayan 1-OHP, dihidrodiol epoksitlerine ve kinonlara metabolize olmaktadır. Faz II reaksiyonları enzimleri üridin difosfo glukuronozil transferaz (UDPGT) ve sülfotransferaz (ST) ile sülfat veya karbohidratla konjuge olarak atılmaktadırlar (Hall ve Grover, 1990).

PAH'lara maruziyetinin izlenmesinde floresans dedektörle kombine yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) idrarda 1-OHP'nin kantitatif tayininde kullanılan başlıca yöntemdir (Jongeneelen ve ark., 1987, Burgaz ve ark., 1998). Birçok çalışma sigara içimi ile idrar 1-OHP konsantrasyonu arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Van Rooij ve ark., 1994; Levin 1995).

1.4.2. Gebelikte Sigara Kullanımı

Gebelikte sigara içimi, gebelik ile ilişkili mortalite ve morbidite için önlenemez önemli bir risk faktörüdür. Kadınlarda ve buna bağlı olarak gebelikte sigara kullanımı giderek artmaktadır. Bir toplumda sigara tüketiminin artması sigaradan kaynaklanan gebelik ile ilgili risklerin artmasına neden olabilmektedir. Sigaranın gebelik dönemindeki olumsuz etkisi gebenin içtiği sigaradan kaynaklandığı gibi ortamdaki sigara dumanından da kaynaklanabilmektedir.

Gebelikte sigara içilmesi veya ortamdaki sigara dumanının solunması, fertilitiyi, fetüsün gelişmesini, gebeliğin her safhasını, doğumu, bebek sağlığını ve gelişimini etkileyebilmektedir. Sigara içmenin üreme işlevi ve fetüs üzerindeki etkileri günümüzde de yaygın olarak araştırılmaktadır. Gebelikte sigara içilmesi gebelikte fetal kayıplara, erken membran rüptürüne, prematur doğum ağrıları ve doğuma,

plasental abrupsiyona, plasenta previaya, hipertansiyona, preeklampsiye, fetal toksisiteye, büyümede gecikmeye, nörotoksisiteye, deformitelere, down sendromu gelişimine, ani bebek ölüm sendromuna, düşük doğum ağırlığına, yeni doğanda hiperviskositeye, bebeklik ve çocukluk esnasında kan basıncının yükselmesine, çocuklarda davranışsal psikiyatrik ve bilişsel yan etkilere, mental retardasyona, çocukluk kanserlerine, respiratuar hastalıklar nedeniyle ölümlere, astma, pnomoni ve diğer respiratuar hastalıklara, otitis media, yanıklar ve yangına bağlı ölümlere yol açabilmektedir (Chatenoud ve ark., 1998; Correia ve ark., 2007; Kaminsky ve ark., 2007).

Amerika Birleşik Devletleri Halk Sağlığı Servisi'ne göre, Birleşik Devletlerdeki bütün gebe kadınların sigarayı bırakması durumunda ölü doğumlarda %11 ve yenidoğan ölümlerinde %5 azalma olacağı tahmin edilmektedir (Surgeon general, 2008).

Ülkemizde gebe kadınlarda sigara içme durumlarını yansıtan yeterli sayıda çalışma yoktur. Erzurum, Bursa, İstanbul ve Samsun'da yapılmış dört çalışmada sigara içme oranları sırasıyla %3, %16, %32, %37 olarak bildirilmiştir (Alp ve ark., 1995; Uncu, 1999; Özsoy, 1992; Üstün ve Malatyalıoğlu, 1990; Marakoğlu ve Sezer, 2003).

Çalışmalarda, anneleri sigara içen bebeklerin doğum ağırlıkları, anneleri sigara içmeyen bebeklere oranla 170-200 gr daha az bulunmaktadır, ayrıca boy, baş çevresi ve göğüs çevresi ölçüleri de düşük bulunmaktadır (Miyao ve ark., 1995; Cornelius ve ark., 1995; McFarlane ve ark., 1996). Japonya'da yapılan geniş bir çalışmada düşük doğum ağırlıkları nedenleri arasında gebelikte sigara içiminin çok önemli olduğu vurgulanmıştır (Maruoka ve ark., 1998).

32 haftadan önce meydana gelen erken doğumlarda sigaranın yakın ilişkisi tespit edilmiştir (Peacock ve ark., 1995; Verkerk ve ark., 1994). Yapılan çalışmalarda günde yirmi sigaradan fazla sigara içen yoğun içici anne bebeklerinde intrauterin gelişme geriliği oranı yaklaşık beş kat artmakta ve doğum ağırlığında içmeyen anne bebeklerine oranla 510 gramlık bir eksiklik tespit edilmektedir (Kalinka ve Hanke,

1996). Sigara içenlerde gestasyonel yaşına göre ufak bebek oranı da içmeyenlerden 3,5-4,5 kat fazla bulunmuştur (Verkerk ve ark., 1994; Muscati ve ark., 1994).

Sigara içenlerin plasentaları, sigara içmeyen veya gebelik öncesi sigarayı bırakanların plasentaları ile karşılaştırıldığında, kapiller volüm fraksiyonunda azalma ve villöz membran kalınlığında artma görülmüştür. Bu değişiklikler plasentanın gaz alış veriş kapasitesini düşürerek bebekte gelişme geriliğine neden olabilmektedir (Bush ve ark., 2000).

Gebelikte sigara içimi plasental damarlanmayı etkilemektedir. Villuslardaki azalmış fetal kapiller çapları plasental kan akımını etkiler ve fetus-anne arasındaki besin ve gaz alışveriş alanının azalması da fetusun yetersiz beslenmesine neden olmaktadır (Larsen ve ark., 2002).

Gebelikte sigara içilmesi gerek sağlıklı nesillerin yetişmesini engellemesi, gerekse anne ve bebek açısından gelişebilecek olumsuzluklara yol açabilmesi nedeniyle bir takım önlemlerin alınmasını gerektiren önemli bir sağlık sorunudur.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Absolü etanol (Sigma, ABD)

β glukuronidaz / aril sülfataz (Sigma, ABD)

DTNB (Sigma, ABD)

EDTA (Merck, Almanya)

Glasiyel asetik asit (Merck, Almanya)

Glutasyon (Sigma, ABD)

HCl (Merck, Almanya)

KCl (Merck, Almanya)

K_2HPO_4 (Merck, Almanya)

KH_2PO_4 (Merck, Almanya)

Kreatinin (Sigma, ABD)

Metanol (Merck, Almanya)

Metanol HPLC grade (Merck, Almanya)

NaOH (Merck, Almanya)

Pikrik asit (Merck, Almanya)

Trikloro asetik asit (Merck, Almanya)

Ultrasaf su (Milli-Q, Millipore cihazı)

1-hidroksi piren (Aldrich Chem. Co.)

2.1.2. Kullanılan Araçlar

Ayarlanabilir otomatik pipetler (Eppendorf)

Azot tüpü

Buz makinası (Hoshizaki)

C18 kartuş (Agilent)

Cam laboratuvar malzemeler

Drying lid manifold (Agilent)

Derin dondurucu (-80°C) (Heto Ultra Freeze)

Hassas terazi (Mettler)

HPLC sistemi (Agilent HP 1100)

Isıtcılı manyetik karıştırıcı (Torrey Pines Scientific)

Kolon (Lichrosorb)

Matkap (black & decker)

pH indikatör kağıdı (Merck)

pH metre (Jenway)

Santrifüj aleti (Hettich)

Su banyosu (Memmert)

Spektrofotometre (Shimadzu UV-160A)

Spektrofotometre küveti

Teflon homojenizatör başlık

Ultrasonik banyo (P-Selecta)

Vakum manifold cihazı (Agilent)

Vakum pompası

Vorteks (Thermolyne)

Vial (Agilent)

Yazılım programı (Software HP Chemstation)

2.1.3. Kullanılan Numunelerin Temini

Tez çalışmasına ait etik kurul onayı Ankara 1 No'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 30.09.2009 tarih ve 2009/09-38 karar no ile alınmıştır. Etik kurul onay yazısı Ek 3'te sunulmuştur. Bu çalışmada numune olarak Zekai Tahir Burak Hastanesi'nden, büyük çoğunluğu 36 haftasını doldurmuş 39 hamile kadından alınan plasenta ve idrar örnekleri ile çalışılmıştır. Sonuçların ayrıntılı incelenmesi için hastaların kalıtsal hastalıkları, sigara içimi, ilaç kullanımı gibi bilgileri içeren anket formları doldurulmuştur. Kişilere çalışmanın konusu, amacı, anket formu ve idrar ve plasenta örneklerinin alınma gerekçeleri anlaşılır bir dille açıklanmıştır. Gönüllü bilgilendirme formu örneği Ek 2'de sunulmuştur. Plasenta ve idrarlar hasta onayı alındıktan sonra doktor gözetiminde alınmıştır. Doğumu takiben en kısa sürede plasenta ve idrar numuneleri alınarak buz içinde veya sıvı azot tankı içinde laboratuvarımıza getirilmiştir. Numuneler analiz yapılincaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Dokuların Eldesi

Doğum sonrası alınan plasenta dokusu %1.15'lik KCI ile yıkanarak kanlarından arındırılmıştır. Daha sonra kurutma kâğıdıyla kurutulan dokular hassas terazi yardımıyla doku ağırlıkları ölçülerek kaydedilmiştir. Tüm bu işlemler buz banyosu içinde yapılmıştır.

2.2.2. Plasentada Glutatyon Tayini

Yöntem sülfidril gruplarının spektrofotometrik ölçümlerine dayanmaktadır. 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) sülfidril grupları (-SH) ile indirgenerek bir mol -SH grubuna karşılık bir mol 2-nitro-5-merkaptobenzoik asidi vermektedir. Nitrobenzoik asidin oluşturduğu kuvvetli sarı rengin şiddeti spektrofotometrede 412 nanometre (nm) dalga boyunda okunmuştur (Sedlak, 1968; Ellman, 1979).

2.2.2.1. Reaksiyon Ortamı

Çizelge 2.1'de görüldüğü gibi reaksiyon ortamı 3 ml'lik toplam hacimde 0,1 ml DTNB, 0,2 ml numune ve 2,7 ml 5 mM EDTA içeren potasyum fosfat tamponu bulunmaktadır.

Çizelge 2.1. GSH ölçümünde kullanılan reaksiyon ortamının elemanları

Elemanlar	Stok Çözeltiler	3 ml reaksiyon ortamına ilave edilecek hacim (ml)
Potasyum fosfat tamponu, pH: 8 (5 mM EDTA içeren)	100 mM	2,7
DTNB	10 mM	0,1
Numune		0,2

2.2.2.2. İşlem

Tartılmış olan plasenta dokusu homojenizasyon işlemini kolaylaştırmak için öncelikle ufak parçalara ayrılmıştır. Bu işlemler 0-4 °C de yapılmıştır. Parçalara ayrılmış organ, teflon cam homojenizasyon aletinin buza yerleştirilen cam kısmına konulmuştur. Üzerine 1 gram doku başına 3 mL olacak şekilde % 1.15'lik KCl

çözeltisinden ilave edilmiştir. Homojenizatörün teflon ucuna takılan matkap 3000 rpm'de döndürülerek dokular homojenize edilmiştir. Homojenize organ üzerine 1 ml doku başına 2 ml olacak şekilde 5 mM EDTA içeren % 10'luk trikloroasetik asit ilave edilerek 25 dakika, 4000 g'de santrifüj edilmiştir. Çöken kısım atılarak üst sıvı kısım GSH düzeyinin saptanması için kullanılmıştır. Reaksiyon ortamına numune, DTNB ve potasyum fosfat tamponu Çizelge 2.1'de belirtilen miktarlarda eklenerek oluşan sarı rengin şiddeti 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Her numune için en az iki ölçüm yapılarak ortalaması alınmıştır.

Okunan absorbans değerlerinin standart GSH kalibrasyon eğrisinden elde edilen eğime bölünüp dilüsyon katsayısı ile çarpılmasıyla glutatyon düzeyleri hesaplanmıştır. Sonuçlar nmol GSH/ ml cinsinden hesaplanmıştır.

2.2.2.3. Standart

2.2.2.3.1. GSH Standart Çözeltisinin Hazırlanması

2,5 mM EDTA çözeltisini hazırlamak için 232,65 mg EDTA tartılıp 250 ml su içinde çözülmüştür.

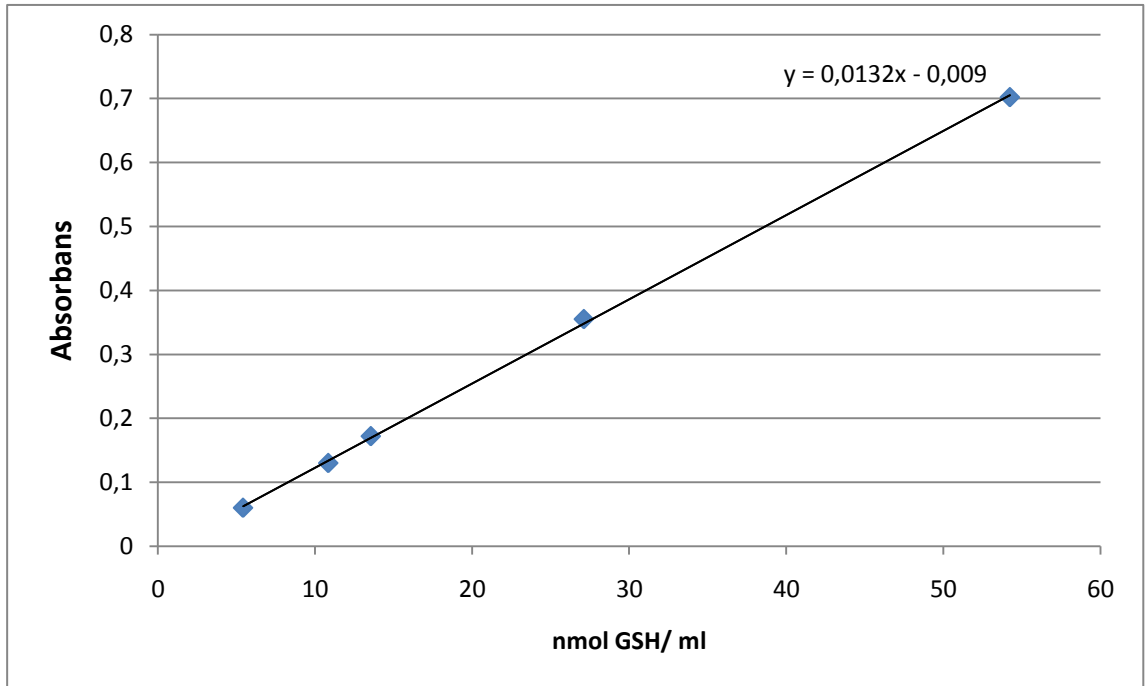
% 5'lik TCA çözeltisini hazırlamak için 12,5 gr TCA tartılıp 250 ml su içinde çözülmüştür.

% 5'lik TCA içeren 2,5 mM EDTA çözeltisi içinde 2 mg/ml GSH hazırlamak için 6 mg GSH tartılıp 3 ml %5'lik TCA içeren EDTA içinde çözülmüştür.

2.2.2.3.2. GSH Standart Kalibrasyon Eğrisi

% 5'lik TCA içeren 2,5 mM EDTA çözeltisi içinde 2 mg/ml GSH stok çözeltisinden 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,1 mg/ml ve 0,05 mg/ml'lik standartlar hazırlanmıştır.

Spektrofotometre aletinin her iki küvetine de 0,1 ml DTNB, 0,2 ml %5'lik TCA içeren 2,5 mM EDTA çözeltisi ve 2,7 ml potasyum fosfat tamponundan koyularak alet sıfırlanmıştır. Sıfırlama işleminden sonra öndeki küvete sırayla 0.2 ml hazırlanan standart çözeltilerinden, 0,1 ml DTNB ve 2,7 ml potasyum fosfat tamponundan ilave edilerek okutma yapılmıştır. Ayrıca deney esnasında da stok çözeltilerden hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki standart glutatyon çözeltileri de küvetlere eklenerek okutma yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri farklı GSH miktarlarına karşı standart eğrinin çiziminde kullanılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. GSH standart eğrisi

2.2.3. İdrarda 1-OHP Tayini

İdrar örneklerinde 1-OHP analizi florometrik dedektörlü HPLC ile Jongeneelen ve arkadaşları (1987) tarafından gerçekleştirilen yöntemle yapılmıştır.

2.2.3.1. Yöntemin Kromatografik Şartları

Kolon: Lichrosorb RP₁₈, 5 µm, 15 cm x 4,6 mm

Hareketli faz: 0–5 dakika arası, metanol: su, 55:45

5–25 dakika arası, metanol: su, 79:21

25-30 dakika arası, metanol: su, 55:45

Kolon sıcaklığı: 40 °C

Akış: 0,8 ml/dakika

Enjeksiyon hacmi: 20 µl

Floresans dedektör: Emisyon dalga boyu: 388 nm

Eksitasyon dalga boyu: 242 nm

Analiz süresi: 30 dakika

Alıkonma zamanı: 22. dakika

2.2.3.2. Çözeltilerin Hazırlanması

2.2.3.2.1. 0,1 M Asetat Tampon Çözeltisi

5,7 ml glasiyel asetik asit ultra saf su ile hacmi 1 litreye tamamlandı ve 2N NaOH ile pH 5'e ayarlandı.

2.2.3.2.2. 1-OHP Başlangıç Çözeltisi

1 mg 1-OHP tartıldı, 10 ml'lik balonjojeye koyuldu. Bir miktar HPLC grade metanol ile madde çözülüp 10 ml'ye metanol ile tamamlandı. 0,1 mg/ml'lik (0,458 mM) hazırlanan çözelti ışık almayacak şekilde -20 °C'de en fazla 2 ay süre ile saklandı.

2.2.3.2.3. 1-OHP Stok Çözeltisi

1mg/ml'lik başlangıç çözeltisinden 10 µl alınıp 10 ml'lik balonjojeye koyuldu ve 10 ml'ye HPLC grade metanol ile tamamlandı. 0,1 µg/ml'lik (458 nM) hazırlanan çözelti ışık almayacak şekilde -20 °C'de en fazla 1 hafta süre ile saklandı.

2.2.3.2.4. Dilüe 1-OHP Stok Çözeltisi

Stok çözeltilerden gerekli dilüsyonlar yapılarak dilüe 1-OHP çözeltileri (0,2- 0,5- 1- 2- 5- 10- 20- 30 nM) hazırlandı. -20 °C'de en fazla 2 gün süre ile saklandı.

2.2.3.2.5. Kalibrasyon Standartları

Santrifüj tüplerine 6 ml 1-OHP içermediği tespit edilen idrar aktarılıp 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj edilmiş idrarın üst kısmından 5 ml alınmıştır. Kalibrasyon standartları (0,2- 0,5- 1- 2- 5- 10- 20- 30 nM) gerekli miktarlarda stok çözeltilerden alınıp idrar ile 5 ml'ye tamamlanmıştır. Numune hazırlama yöntemi uygulanmıştır.

Ayrıca dilüe 1-OHP stok çözeltilerinden HPLC cihazına 2'şer enjeksiyon yapılmış ve bu konsantrasyonlardaki 1-OHP'nin cihaz tarafından ölçülen alanına karşılık regresyon eğrisi çizilmiştir.

2.2.3.3. İdrar Örneklerinin Analiz için Hazırlanması

1. Hidroliz

İdrar numuneleri -20 °C sıcaklıktaki dondurucudan alınıp erimesi beklendi, eriyen numuneler vorteks ile karıştırıldı. Santrifüj tüplerine 6 ml idrar aktarıldı ve 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj edilmiş idrarın üst kısmından 5 ml alınıp erlene aktarıldı. Erlene 10 ml 0,1M asetat tampon ilave edildi ve 4N HCl ile pH 5'e ayarlandı. Son olarak 6,25 µl β glukuronidaz/ aril sülfataz ilave edildi. Erlen alüminyum folyaya sarılıp 37 °C'lik çalkalamalı su banyosunda 16 saat bekletildi.

2. Ekstraksiyon

Vakum manifolduna yerleştirilen C18 kolondan vakum pompası çalıştırılarak önce 2,5 ml metanol sonra 5 ml ultra saf su geçirilerek kolon yıkandı. Birinci basamakta, hidroliz işlemi sonucu elde edilen 15 ml hidrolize idrar 10 ml/dakika hızla kolondan geçirildi. Hidrolize idrar kolondan geçirildikten sonra kolon 5 ml ultra saf su ile yıkandı. Elüsyondan önce kolondan tüm suyun çıktığına emin olmak için bir miktar hava kolondan geçirildi. Kolondan 4,5 ml metanol geçirilip manifold içine yerleştirilen tüpte elüat toplandı. 50 °C'de drying manifoldla azot gazı altında metanolün tamamı uçuruldu, atık 0,5 ml HPLC grade metanolda çözülerek 4 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. Vorteksle karıştırıldıktan sonra 5 dakika 600 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj edilmiş ekstrenin üst kısmından 0,4 ml alınıp vialde alındı ve analize kadar -20 °C'de saklandı.

2.2.3.4. İdrarda 1-OHP'nin HPLC ile Tayin Yönteminin Validasyonu

Bir biyoanalitik yöntemin validasyonu yöntemin performans ve güvenilirliğini göstermek amacıyla yapılmaktadır. Biyoanalitik yöntem validasyonu, bir analitin ya da analit serisinin konsantrasyonunun bir biyolojik matrikste kantitatif olarak saptanması için kullanılan yöntemin bu amaç için güvenilir olduğunun gösterilmesi

için gerekli işlemlerin tümünü içermektedir (Shah ve Midha, 1992; Shah ve ark., 2000). Bu nedenle bu çalışmada analiz yönteminin laboratuvar içi geçerliliğini ortaya koyabilmek için ilgili çalışmalar yapılmıştır.

2.2.3.4.1. Özgünlük ve Seçicilik

Dilüe 1-OHP stok çözeltilerinin alıkonma zamanları ölçülmüştür. 1-OHP içermeyen idrarların ekstraksiyonu yapılmıştır ve belirtilen alıkonma zamanında herhangi bir kirlilik veya yabancı pik olup olmadığına bakılmıştır (FDA Guidance, 2001).

2.2.3.4.2. Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Alt Limiti (LOQ)

Tespit limiti, zemin gürültüsünden farklı olarak tespit edilen, miktarı belirlenemeyen en küçük analit konsantrasyondur (FDA Guidance, 2001). Kromatografik ölçümlerde pratik bir kural olarak sinyal/gürültü (S/N) oranından faydalanılmaktadır. S/N oranının 3 olduğu değer LOD değeridir. Ancak aletlere, lambaya, matrikse (idrar, plasma v.s.) göre değişmektedir (Swartz ve Krull, 1997).

Ölçüm alt limiti ise, uygun doğruluk ve kesinlik sınırları içerisinde kantitatif olarak tespit edilebilen numunedeki en düşük analit miktardır. Ölçüm alt limiti 1-OHP içermeyen idrarlara azalan konsantrasyonlarda katım yapılarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisindeki en düşük konsantrasyon değeri LOQ olarak kabul edildi.

2.2.3.4.3. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

1-OHP kalibrasyon standartlarına karşı dedektörün cevabını belli konsantrasyon aralığındaki doğrusallığını belirlemek için Bölüm 2.2.3.2.5’de anlatıldığı gibi 8 ayrı konsantrasyondan 4’er adet standart hazırlandı ve numune hazırlama yöntemiyle ekstraksiyonları ve analizleri yapıldı, her standarttan ikişer kez enjekte edildi.

2.2.3.4.4. Doğruluk ve Kesinlik

2.2.3.4.4.1. Gün İçi Tekrarlanabilirlik

1-OHP içermeyen bir idrara 1-OHP eklenerek 3 farklı konsantrasyonda (0.2, 2, 30 nM) 5'er adet standart hazırlandı. Analiz sonuçlarının ortalama, standart sapma ve RSD değerleri hesaplanmıştır.

2.2.3.4.4.2. Gün Arası Tekrarlanabilirlik

1-OHP içermeyen bir idrara 1-OHP eklenerek 3 farklı konsantrasyonda (0.2, 2, 30 nM) 5'er adet standart hazırlandı 5 gün boyunca analiz edildi. Analiz sonuçlarının ortalama, standart sapma ve RSD değerleri hesaplanmıştır.

2.2.3.4.5. Geri Kazanım

Geri kazanım için üç farklı konsantrasyonda (0.2, 2, 30 nM) hazırlanan 5 adet numune ve aynı konsantrasyonda hareketli faz ile hazırlanan ve ekstre edilmemiş 5 adet standart analiz edildi. Ekstre edilmiş numunelerin alanları hareketli faz içinde hazırlanan standartların alanlarına oranlanarak geri kazanım hesaplanmıştır.

2.2.4. Kreatinin Tayini

Farklı atılım oranları nedeni ile spot idrar konsantrasyonları çeşitlilik gösterebilmektedir, ancak düzeltme yapılarak $\mu\text{mol/mol}$ kreatinin cinsinden ifade edilmesi 24 saatlik yerine spot idrar kullanabilmemizi sağlamıştır (Schierl, 2000). Bu nedenle analiz edilen insan idrar örneklerinden HPLC yöntemiyle tespit edilen nmol/L cinsinden sonuçlar, spektrofotometre ile ölçülen kreatinin miktarları göz önünde bulundurularak düzeltilmiş ve $\mu\text{mol/mol}$ kreatinin cinsinden ifade edilmiştir.

İdrarda, böbrek fonksiyonun bir göstergesi olan kreatinin ölçümleri spektrofotometrik olarak alkali pikrat yöntemi ile saptanmıştır (Mark ve Zimmer, 1967). Bu metot alkali ortamda (NaOH varlığında) pikrat iyonlarının kreatinin ile sarı turuncu renkte bir kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Oluşan renkli kompleksin absorbanı 520 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.

Kreatinin standartları absorban değerleri ile kalibrasyon eğrisi çizilmiştir, çizilen kalibrasyon eğrisinden idrardaki kreatinin miktarlarının tayini hesaplanmıştır.

2.2.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Pikrik asit çözeltisinin hazırlanması için 2,9 g pikrik asit distile su ile 250 ml’ye balonjojede tamamlanmıştır. Balonjoje alüminyum folyaya sarılıp 80°C ısıtılmış su banyosunda çözülmüştür.

1 mg/ml stok kreatinin çözeltisini hazırlamak için 0,25 g kreatinin 0,1N HCl ile 250 ml’ye tamamlanmıştır.

2.2.4.2. Standart

Standart olarak kreatinin çözeltisi kullanılmıştır. 0.1 mg/ml kreatinin çözeltisi günlük hazırlanmıştır. Stok kreatinin çözeltisinden belli miktarlarda alınıp, uygun seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonda çözelti elde edilmiştir (0.2 mg/100 ml, 0.4 mg/100ml, 0.6 mg/100ml, 0.8 mg/100ml, 1 mg/100ml). Çizelge 2.2’de gösterilen miktarlarda çözeltiler ilave edilip karıştırıldıktan 10 dakika sonra 520 nm’de köre karşı absorbanları okunarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 2.2).

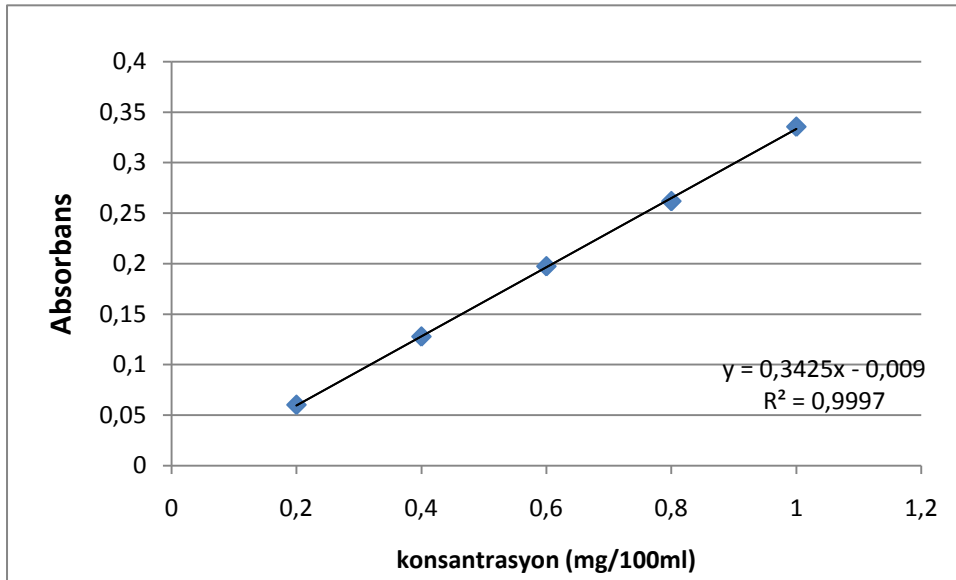
Çizelge 2.2. Kalibrasyon standartları için gerekli çözelti miktarları

	Toplam Hacim (ml)	A (ml)	B (ml)	C (ml)
Kör	8	0	5	3
0,2 mg/100 ml	8	1	4	3
0,4 mg/100 ml	8	2	3	3
0,6 mg/100 ml	8	3	2	3
0,8 mg/100 ml	8	4	1	3
1 mg/100 ml	8	5	0	3

A: 0,01 mg/ml seyreltik kreatinin çözeltisi

B: Distile su

C: 2,5 ml pikrik asit + 0,5 ml % 10 NaOH

**Şekil 2.2.** Kreatinin kalibrasyon eğrisi

2.2.4.3. İşlem

İdrar numunelerinden 5 ml alınarak santrifüj tüplerine konulduktan sonra 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 0,05 ml alınıp üzeri distile su ile 5 mL'ye tamamlanıp vortekslenmiştir. Daha sonra üzerine 2,5 ml pikrik asit ve 0,5 ml %10 NaOH ilave edilip vortekslenedikten 10 dakika sonra 520 nm'de köre karşı absorbansları ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisinden elde edilen doğru denkleminde yerine konularak kreatinin konsantrasyonu mg/100ml cinsinden hesaplanmıştır.

2.2.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntem

Ortalamaları alınan deney sonuçları \pm standart hataları ile birlikte gösterilmiştir. Çalışma ve kontrol gruplarının kendi aralarında karşılaştırılması için Student's t-test, değişkenler arasındaki ilişki için Pearson korelasyon analizi ile değerlendirme yapılmıştır. İstatistiki değerlendirmeler için "SPSS 13.0 for Windows" istatistik paket programından yararlanılmıştır.

3. BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan plasenta ve idrar numunelerinin alındığı bireylerin genel özellikleri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Plasenta ve idrar numuneleri alınan bireylerin genel özellikleri

Parametreler	Plasenta ve İdrar Numunesi Alınan Bireyler
n	39
sigara içen bireyler	8
sigara dumanına maruz kalan bireyler	9
sigara içmeyen bireyler	22

Yaş	27,2 ± 5,5
sigara içen bireyler	25,4 ± 3,6
sigara dumanına maruz kalan bireyler	26,8 ± 3,9
sigara içmeyen bireyler	27,72 ± 6,5

3.1. İnsan Plasentasında Glutatyon Düzeyleri

İnsan plasentasında bulunan sonuçlar aşağıda gösterilmiştir. 8 sigara içen, 9 sigara dumanına maruz kalan ve 22 sigara içmeyen bireyden alınan plasentalarda glutatyon düzeylerine bakılmıştır (Çizelge 3.2.). Sigara içenlerin plasentasındaki GSH ölçüm sonuçları Çizelge 3.3’te, sigara dumanına maruz kalanların plasentasındaki GSH ölçüm sonuçları Çizelge 3.4’te, sigaranın içmeyenlerin plasentasındaki GSH ölçüm

sonuçları Çizelge 3.5'te ve sigara kullanımı ile GSH ilişkisi Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. İnsan plasentasında glutatyon düzeyleri

No	Adı ve Soyadı	Glutatyon düzeyleri (nmolGSH/ml)
1	F.Y.	368,25 ± 15,26
2	M.A.	1064,36 ± 17,8
3	S.Y.	616,93 ± 11,32
4	F.G.	877,23 ± 12,06
5	T.Ö.	1089,97 ± 10,94
6	E.Y.	884,13 ± 13,19
7	N.B.	891,01 ± 12,47
8	L.K.	1153,65 ± 12,35
9	D.E.	1118,25 ± 24,99
10	R.Ü.	842,54 ± 17,68
11	M.Ö.	579,36 ± 15,17
12	G.A.	906,88 ± 10,44
13	A.Y.	954,94 ± 13,01
14	S.G.	828,57 ± 10,88
15	D.E.	1293,65 ± 12,5
16	Z.D.	1077,77 ± 11,86
17	S.E.	275,13 ± 19,62
18	S.K.	880,95 ± 10,61
19	M.A.	803,71 ± 10,77

20	A.A.	726,99 ± 13,34
21	F.Ç.	826,98 ± 17,64
22	G.G.	1140,76 ± 10,66
23	S.K.	973,54 ± 11,16
24	N.Y.	675,66 ± 10,86
25	D.A.	717,99 ± 11,62
26	Ö.S.	1221,16 ± 15,97
27	G. Ş. C.	731,426 ± 13,17
28	A.T.	919,57 ± 10,44
29	S.D.	968,25 ± 19,64
30	F.D.	1120,88 ± 17,31
31	M.G.	921,16 ± 14,9
32	Ş.Y.	1210,05 ± 12,17
33	R.M.Y.	1012,16 ± 11,12
34	E.Ö	906,88 ± 13,33
35	K.G.	1058,23 ± 10,94
36	. H.T.	1251,32 ± 11,19
37	F.G	1235,44 ± 12,4
38	S.H.	1253,15 ± 10,73
39	S.S.	1187,4 ± 13,69
Ortalama		937,59 ± 236,73

- Her değer iki ayrı deney sonucunun ortalamasını (\pm S.S.) göstermektedir. Her deney kendi içinde 3'lü çalışılmıştır.

Çizelge 3.3. Sigara içen bireylerin plasentalarında glutatyon düzeyi ölçümü

No	Ad soyad	Sigara/ gün	Glutatyon düzeyleri (nmolGSH/ml)
1	S.E.	1-2 adet	275,13 ± 19,62
2	S.D.	2-3 adet	968,25 ± 19,64
3	D.E.	1-2 adet	1293,65 ± 12,5
4	A.A.	1-2 adet	726,99 ± 13,34
5	F.Y.	6-7 adet	368,25 ± 15,26
6	N.Y.	3-4 adet	675,66 ± 10,86
7	D.A.	1-2 adet	717,99 ± 11,62
8	S.Y.	3-4 adet	616,93 ± 11,32
Ortalama			705,36 ± 321,44

- Her değer iki ayrı deney sonucunun ortalamasını (\pm S.S.) göstermektedir. Her deney kendi içinde 3'lü çalışılmıştır.

Çizelge 3.4. Sigara dumanına maruz kalan bireylerin plasentalarında glutatyon düzeyi ölçümü

No	Ad soyad	Glutatyon düzeyleri (nmolGSH/ml)
1	H.T.	1251,32 ± 11,19
2	R.Ü.	842,54 ± 17,68
3	M.A.	1064,36 ± 17,8
4	A.Y.	954,94 ± 13,01
5	T.Ö.	1089,97 ± 10,94
6	S.K.	880,95 ± 10,61
7	M.A.	803,71 ± 10,77
8	G.A.	906,88 ± 10,44
9	D.E.	1118,25 ± 24,99
Ortalama		990,32 ± 148,63

- Her değer iki ayrı deney sonucunun ortalamasını (\pm S.S.) göstermektedir. Her deney kendi içinde 3'lü çalışılmıştır.

Çizelge 3.5. Sigara içmeyen bireylerin plasentalarında glutatyon düzeyi ölçümü

No	Ad soyad	Glutatyon düzeyleri (nmolGSH/ml)
1	S.H.	1253,15 ± 10,73
2	R.M.Y.	1012,16 ± 11,12
3	E.Ö.	906,88 ± 13,33
4	S.S	1187,4 ± 13,69
5	F.G.	877,23 ± 12,06
6	A.T.	919,57 ± 10,44
7	N.B.	891,01 ± 12,47
8	L.K.	1153,65 ± 12,35
9	E.Y.	884,13 ± 13,19
10	M.Ö.	579,36 ± 5,17
11	G.G.	1140,76 ± 11,66
12	Ş.Y.	1210,05 ± 12,17
13	S.G	828,57 ± 10,88
14	Ö.S.	1221,16 ± 15,97
15	S.K.	973,54 ± 11,16
16	G.Ş.C.	731,426 ± 13,17
17	F.D.	1120,88 ± 17,31
18	F.G.	1235,44 ± 12,4
19	Z.D.	1077,77 ± 11,86
20	F.Ç.	826,98 ± 17,64
21	M.G.	921,16 ± 14,9
22	K.G.	1058,23 ± 10,94
Ortalama		1000,48 ± 180,75

- Her değer iki ayrı deney sonucunun ortalamasını (±S.S.) göstermektedir. Her deney kendi içinde 3'lü çalışılmıştır.

Çizelge 3.6. Sigara kullanımı ile GSH ilişkisi

	n	Glutasyon düzeyleri (nmolGSH/ml)
Sigara içenlerde	8	705,36 ± 321,44 *
Sigara dumanına maruz kalanlarda	9	990,32 ± 148,63
Sigara içmeyenlerde	22	1000,48 ± 180,75
Tümü	39	937,59 ± 236,73

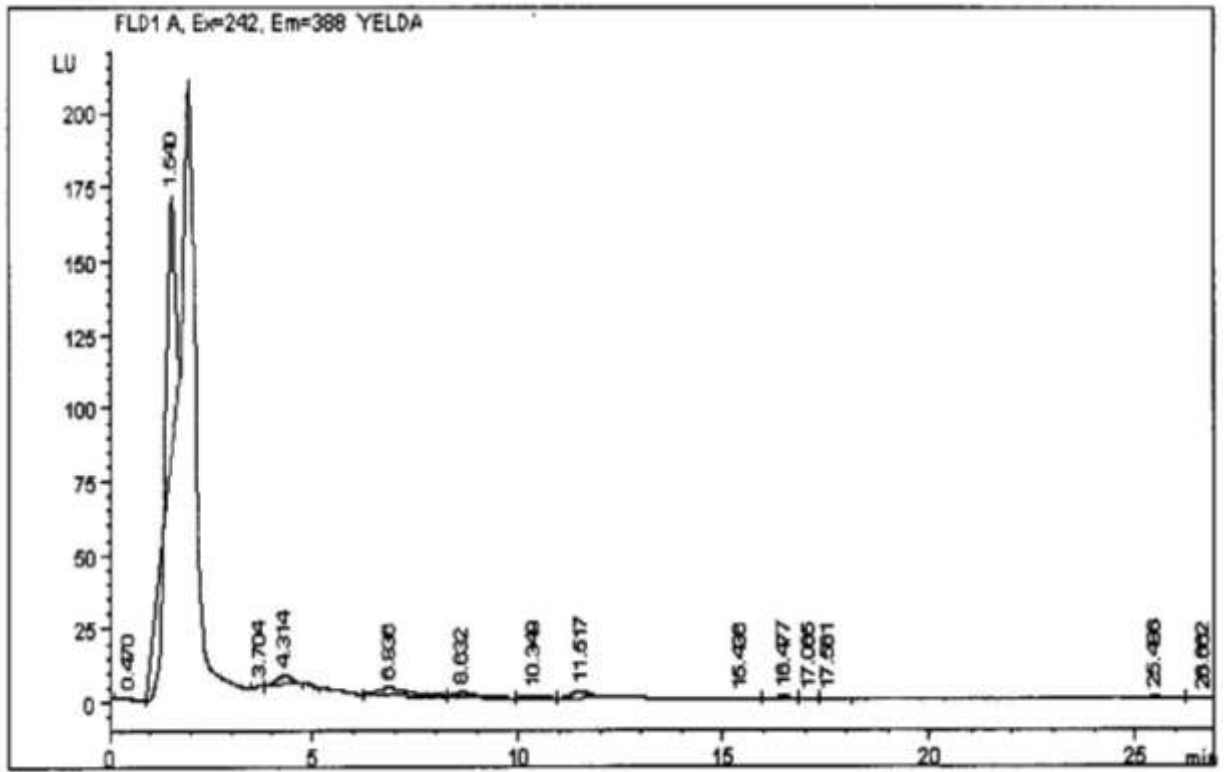
* $p < 0,05$ Sigara içmeyenlere ve sigara dumanına maruz kalanlara göre fark anlamlı

3.2. İdrarda 1-OHP'nin HPLC ile Tayin Yönteminin Validasyon Sonuçları

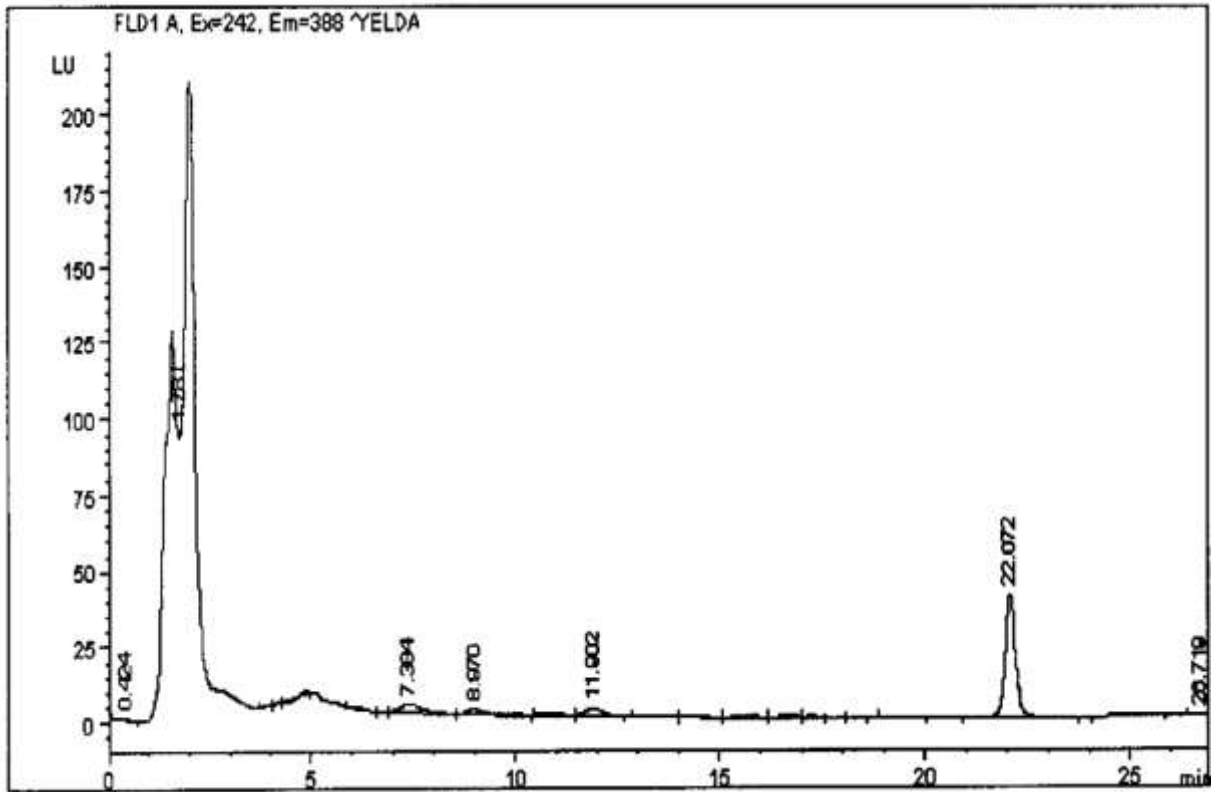
İdrar örneklerindeki 1-OHP düzeylerinin belirlenebilmesi için kullanılacak yöntemin geçerliğini ortaya koyacak olan özgünlük ve seçicilik, tespit ve ölçüm limiti, doğrusalılık, doğruluk ve kesinlik, geri kazanım gibi parametreleri içeren yöntem validasyon çalışmasına ait sonuçlar aşağıda verilmiştir.

3.2.1. Özgünlük ve Seçicilik

1-OHP için alıkonma zamanı 22 dakika olarak bulundu. 1-OHP içermeyen idrarların ekstraksiyonu yapıldı ve belirtilen alıkonma zamanında herhangi bir kirlilik veya yabancı pik gözlenmedi (Şekil 3.1). 1-OHP ilave edilen idrara ait kromatogram Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Analiz yöntemi özgünlük ve seçicilik kriterlerine uygun bulunmuştur.



Şekil 3.1. 1-OHP içermeyen idrar örneğine ait kromatogram



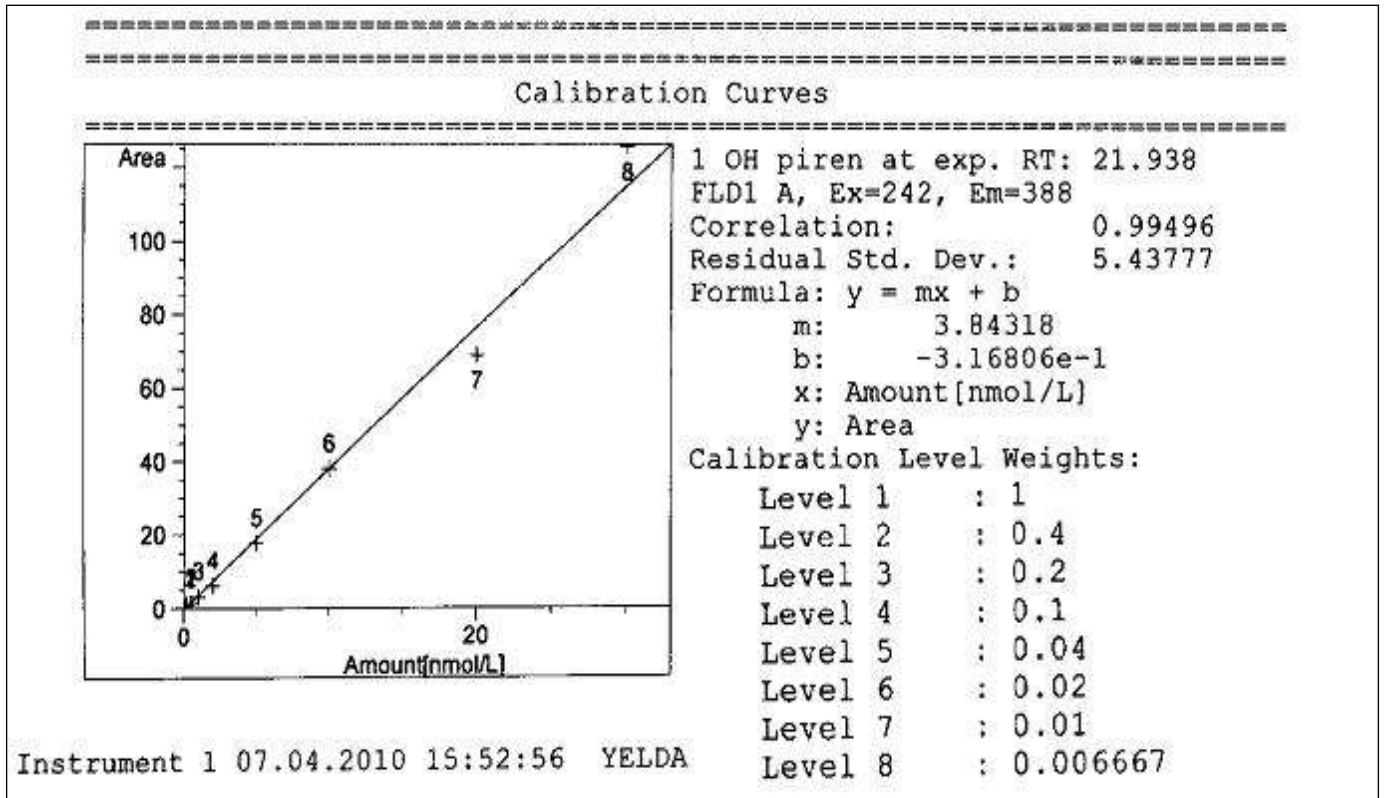
Şekil 3.2. 10 nM düzeyinde 1-OHP eklenmiş idrar örneğine ait kromatogram

3.2.2. Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Alt Limiti (LOQ)

Tespit edilebilir minimum 1-OHP konsantrasyonu (LOD) 0,06 nM, katım deneyleri sonucunda tayin edilebilir minimum 1-OHP konsantrasyonu (LOQ) değeri 0,2 nM olarak belirlenmiştir.

3.2.3. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

2.2.3.4.3'te anlatıldığı gibi çalışılarak 1-OHP kalibrasyon standartlarına karşı dedektörün cevabına ait kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. 1-OHP eklenmiş idrar örneklerinde yapılan analizlerden elde edilen alan ile konsantrasyon arasındaki korelasyonu gösteren grafik

1-OHP ait elde edilen regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı aşağıda verilmiştir:

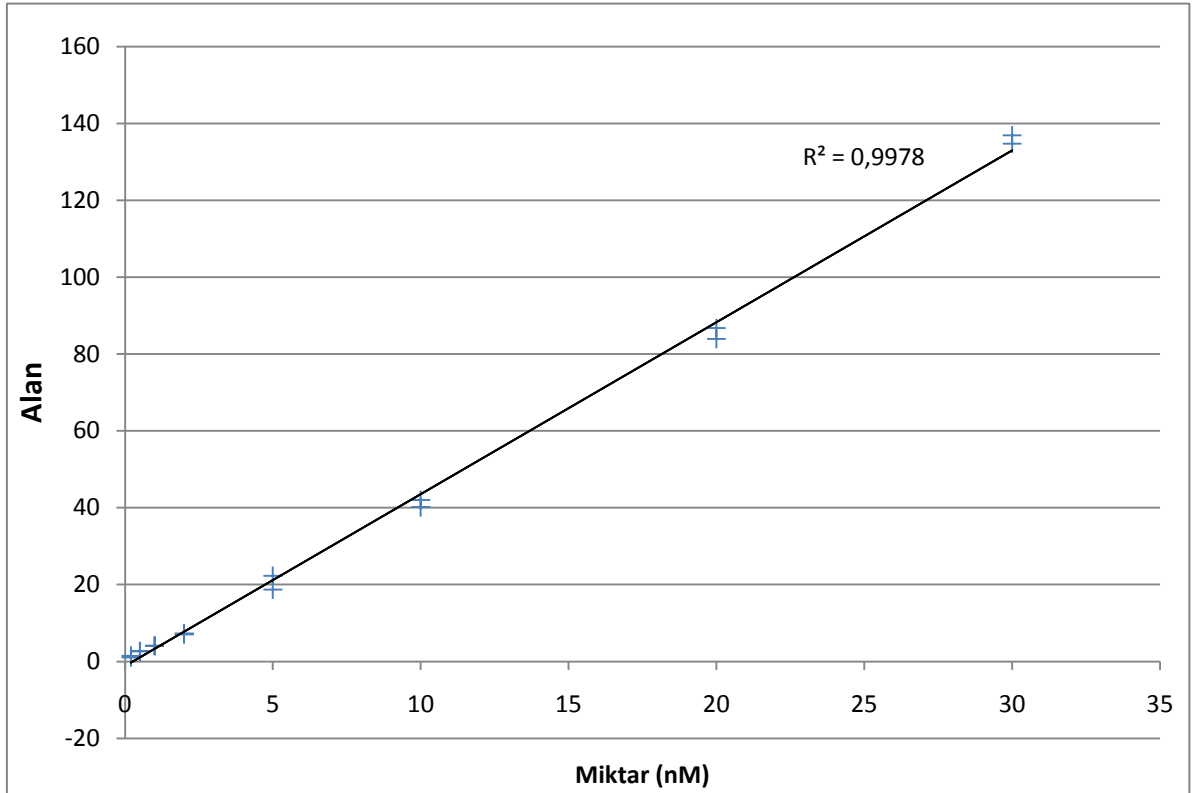
$$y = mx+b$$

$$y = 3,84318x-0,316806$$

$$r = 0,99496$$

Analitik yöntemin konsantrasyon aralığında doğruluğu kanıtlanmıştır.

Ayrıca metanol içinde hazırlanan 1-OHP çözeltilerinden HPLC cihazına 2'şer enjeksiyon yapılmış ve bu konsantrasyonlardaki 1-OHP'nin cihaz tarafından ölçülen alanına karşılık regresyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. 1-OHP eklenmiş metanol çözeltilerinden elde edilen alan ile konsantrasyon arasındaki korelasyonu gösteren grafik

3.2.4. Doğruluk ve Kesinlik

3.2.4.1. Gün İçi Tekrarlanabilirlik

2.2.3.4.4.1.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltilerden elde edilen pik alanları, standart sapmaları ve RSD değerleri Çizelge 3.7'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.7. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmaları

Örnek no	0,2 nM	2nM	30nM
1	0,86	6,02	125,72
2	0,83	6,1	124,9
3	0,82	6,2	125,53
4	0,90	6,16	125,6
5	0,85	6,06	125,07
Ortalama alan	0,852	6,108	125,362
Standart sapma	0,031	0,073	0,36
RSD (%)	3,64	1,19	0,29

3.2.4.2. Gün Arası Tekrarlanabilirlik

2.2.3.4.4.2.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltilerden elde edilen pik alanları, standart sapmaları ve RSD değerleri Çizelge 3.8'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.8. Gün arası tekrarlanabilirlik çalışmaları

Örnek no	0,2 nM	2nM	30nM
1.gün ortalaması	0,87	6,09	125,91
2.gün ortalaması	0,95	5,92	126,52
3.gün ortalaması	0,99	5,83	125,79
4.gün ortalaması	0,80	6,13	123,18
5.gün ortalaması	0,97	6,2	127,1
Ortalama alan	0,916	6,034	125,7
Standart sapma	0,08	0,153	1,5
RSD (%)	8,73	2,53	1,19

3.2.5. Geri Kazanım

2.2.3.4.5’de anlatıldığı gibi çalışılarak geri kazanım hesaplanmıştır. Buna göre geri kazanım 0,2 nM için % 66,56, 2 nM için % 85,01 ve 30 nM için % 92,3 olarak bulunmuştur. Çizelge 3.9’da geri kazanım çalışmaları sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 3.9. Geri kazanım çalışmaları

Hareketli faz içinde hazırlanan stdlar		Katım yapılmış ekstre edilmiş numuneler	
Miktar	Ort. Alan	Miktar	Ort. Alan
0,2 nM	1,28	0,2 nM	0,852
2 nM	7,185	2 nM	6,108
30 nM	135,8	30 nM	125,362

3.3. İdrarda Kreatinin Ölçümleri

2.2.4.2'de anlatıldığı gibi çalışılarak sigara içen, sigara dumanına maruz kalan ve sigara içmeyen kişilerin idrarlarındaki kreatinin miktarları bulunmuştur (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. İdrar numunelerindeki kreatinin (mg/100ml) düzeyleri

No	Ad soyad	Sigara/ gün	Kreatinin (mg/100ml)
1	S.H.	-	0,536 ± 0,004
2	R.M.Y.	-	1,187 ± 0,058
3	E.Ö.	-	0,96 ± 0,0311
4	S.E.	1-2 adet	0,574 ± 0,001
5	S.S	-	0,637 ± 0,006
6	F.G.	-	0,548 ± 0,006
7	A.T.	-	0,607 ± 0,009
8	N.B.	-	1,359 ± 0,004
9	L.K.	-	0,512 ± 0,083
10	E.Y.	-	0,785 ± 0,008
11	M.Ö.	-	0,974 ± 0,004
12	G.G.	-	2,86 ± 0,007
13	D.E.	sigara içilen ortamda bulundu	0,643 ± 0,004
14	Ş.Y.	-	3,144 ± 0,014
15	S.G	-	1,009 ± 0,010
16	S.D.	2-3 adet	0,659 ± 0,0007
17	H.T.	sigara içilen ortamda bulundu	0,552 ± 0,0743
18	Ö.S.	-	1,277 ± 0,0160
19	R.Ü.	sigara içilen ortamda bulundu	0,529 ± 0,0015
20	D.E.	1-2 adet	0,522 ± 0,003

21	S.Y.	3-4 adet	$0,598 \pm 0,008$
22	S.K.	-	$0,531 \pm 0,001$
23	G.Ş.C.	-	$1,312 \pm 0,025$
24	M.A.	sigara içilen ortamda bulundu	$0,687 \pm 0,011$
25	F.D.	-	$1,904 \pm 0,012$
26	F.G.	-	$2,968 \pm 0,015$
27	A.Y.	sigara içilen ortamda bulundu	$2,161 \pm 0,002$
28	T.Ö.	sigara içilen ortamda bulundu	$1,435 \pm 0,011$
29	S.K.	sigara içilen ortamda bulundu	$2,469 \pm 0,012$
30	Z.D.	-	$2,008 \pm 0,006$
31	M.A.	sigara içilen ortamda bulundu	$0,627 \pm 0,002$
32	A.A.	1-2 adet	$0,585 \pm 0,019$
33	F.Y.	6-7 adet	$0,878 \pm 0,011$
34	N.Y.	3-4 adet	$0,590 \pm 0,84$
35	F.Ç.	-	$0,936 \pm 0,020$
36	G.A.	sigara içilen ortamda bulundu	$2,096 \pm 0,036$
37	D.A.	1-2 adet	$0,799 \pm 0,006$
38	K.G.	-	$0,593 \pm 0,027$
39	M.G.	-	$1,118 \pm 0,010$
Ortalama			$1,110 \pm 0,922$

3.4. İdrarda 1-OHP Düzeyleri

2.2.3.3'te anlatıldığı şekilde analizleri yapılan idrar numunelerine ait sonuçlar Çizelge 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15'te gösterilmektedir. Çalışmaya katılan bireylerin plasental glutatyon düzeyi ile idrar 1-OHP düzeyleri Çizelge 3.16, 3.17, 3.18'de, sonuçlara ait grafikler Şekil 3.5, 3.6, 3.7'de gösterilmektedir. Çalışmaya katılan bireylerin plasental glutatyon düzeyi ile idrar 1-OHP düzeyleri arasındaki korelasyon sonuçları Çizelge 3.19'da gösterilmektedir.

Çizelge 3.11. İdrarda 1-OHP düzeyleri

No	Adı ve Soyadı	1-OHP düzeyleri (nM)	1-OHP düzeyleri (µmol/mol kreatinin)
1	F.Y.	18,01	0,231
2	M.A.	2,61	0,043
3	S.Y.	7,42	0,140
4	F.G.	0,28	0,001
5	T.Ö.	0,77	0,006
6	E.Y.	0,25	0,004
7	N.B.	1,93	0,015
8	L.K.	0,76	0,017
9	D.E.	7,32	0,083
10	R.Ü.	5,73	0,122
11	M.Ö.	1,09	0,013
12	G.A.	6,60	0,037
13	A.Y.	4,65	0,024
14	S.G.	2,21	0,025
15	D.E.	15,17	0,330
16	Z.D.	0,56	0,003
17	S.E.	26,18	0,513
18	S.K.	5,10	0,023

19	M.A.	0,56	0,010
20	A.A.	13,06	0,251
21	F.Ç.	0,43	0,005
22	G.G.	1,54	0,006
23	S.K.	8,89	0,189
24	N.Y.	7,56	0,145
25	D.A.	9,94	0,140
26	Ö.S.	1,34	0,012
27	G.Ş.C.	1,86	0,015
28	A.T.	0,40	0,007
29	S.D.	7,15	0,123
30	F.D.	3,29	0,019
31	M.G.	2,85	0,046
32	Ş.Y.	3,73	0,013
33	R.M.Y.	0,34	0,003
34	E.Ö	2,02	0,024
35	K.G.	T.E.	T.E.
36	H.T.	4,90	0,100
37	F.G.	1,70	0,035
38	S.H.	1,74	0,037
39	S.S.	2,27	0,041
Ortalama		4,67 ± 5,56	0,073 ± 0,107

Çizelge 3.12. Sigara içen bireylerin idrarlarında 1-OHP düzeyleri

No	Ad soyad	1-OHP düzeyleri (nM)	1-OHP düzeyleri (µmol/mol kreatinin)
1	S.E.	26,18	0,513
2	S.D.	7,15	0,123
3	D.E.	15,17	0,330
4	A.A.	13,06	0,251
5	F.Y.	18,01	0,231
6	N.Y.	7,56	0,145
7	D.A.	9,94	0,140
8	S.Y.	7,42	0,140
Ortalama		13,06 ± 6,63	0,234 ± 0,134

Çizelge 3.13. Sigara dumanına maruz kalan bireylerin idrarlarında 1-OHP düzeyleri

No	Ad soyad	1-OHP düzeyleri (nM)	1-OHP düzeyleri (µmol/mol kreatinin)
1	H.T.	4,90	0,100
2	R.Ü.	5,73	0,122
3	M.A.	2,61	0,043
4	A.Y.	4,65	0,024
5	T.Ö.	0,77	0,006
6	S.K.	5,10	0,023
7	M.A.	0,56	0,010
8	G.A.	6,60	0,037
9	D.E.	7,32	0,083
Ortalama		4,25 ± 2,42	0,05 ± 0,04

Çizelge 3.14. Sigara içmeyen bireylerin idrarlarında 1-OHP düzeyleri

No	Ad soyad	1-OHP düzeyleri (nM)	1-OHP düzeyleri (μ mol/mol kreatinin)
1	S.H.	1,74	0,037
2	R.M.Y.	0,34	0,003
3	E.Ö.	2,02	0,024
4	S.S	2,27	0,041
5	F.G.	0,28	0,001
6	A.T.	0,40	0,007
7	N.B.	1,93	0,015
8	L.K.	0,76	0,017
9	E.Y.	0,25	0,004
10	M.Ö.	1,09	0,013
11	G.G.	1,54	0,006
12	Ş.Y.	3,73	0,013
13	S.G	2,21	0,025
14	Ö.S.	1,34	0,012
15	S.K.	8,89	0,189
16	G.Ş.C.	1,86	0,015
17	F.D.	3,29	0,019
18	F.G.	1,70	0,035
19	Z.D.	0,56	0,003
20	F.Ç.	0,43	0,005
21	M.G.	2,85	0,046
22	K.G.	T.E.	T.E.
Ortalama		1,79 \pm 1,89	0,024 \pm 0,039

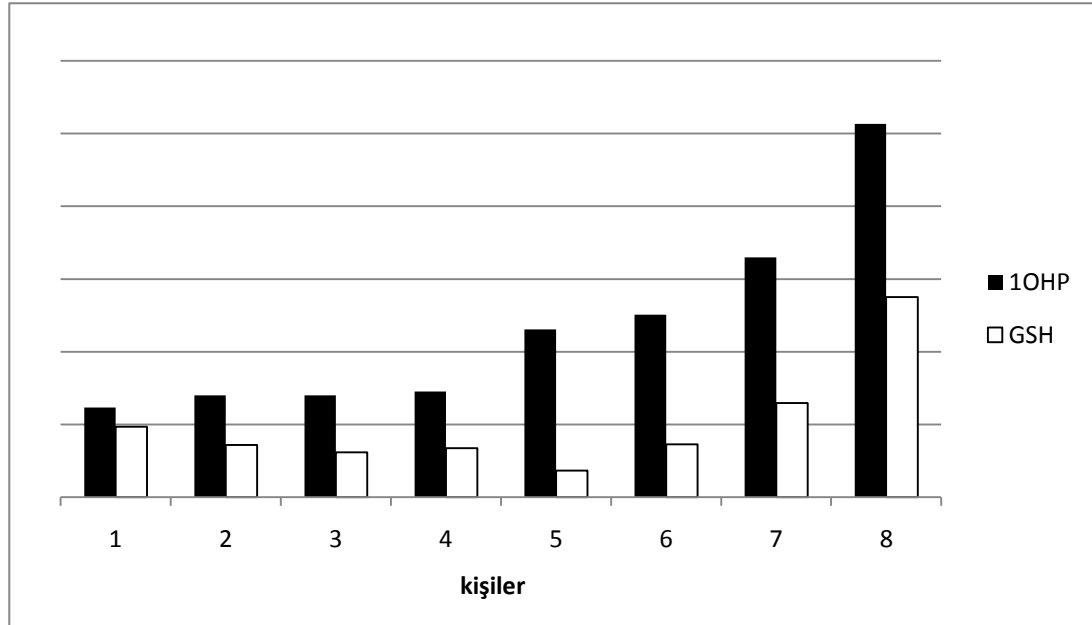
Çizelge 3.15. Çalışmaya katılan bireylerin idrarlarında 1-OHP düzeyleri

	n	1-OHP düzeyi sınırları (µmol/mol kreatinin)	1-OHP düzeyleri (µmol/mol kreatinin)
Sigara içenlerde	8	0,123-0,513	0,234 ± 0,134*
Sigara dumanına maruz kalanlarda	9	0,006-0,122	0,05 ± 0,04
Sigara içmeyenlerde	22	0,001-0,189	0,024 ± 0,039
Tümü	39	0,001-0,513	0,073 ± 0,107

* p < 0,05 Sigara içmeyenlere ve sigara dumanına maruz kalanlara göre fark anlamlı

Çizelge 3.16. Sigara içen bireylerin plasentalarında glutatyon düzeyleri ve idrarlarında 1-OHP düzeyleri

No	Ad soyad	Glutatyon düzeyleri (nmolGSH/ml)	1-OHP düzeyleri (µmol/mol kreatinin)
1	S.E.	275,13	0,513
2	S.D.	968,25	0,123
3	D.E.	1293,65	0,330
4	A.A.	726,99	0,251
5	F.Y.	368,25	0,231
6	N.Y.	675,66	0,145
7	D.A.	717,99	0,140
8	S.Y.	616,93	0,140
Ortalama		705,36 ± 321,44	0,234 ± 0,134

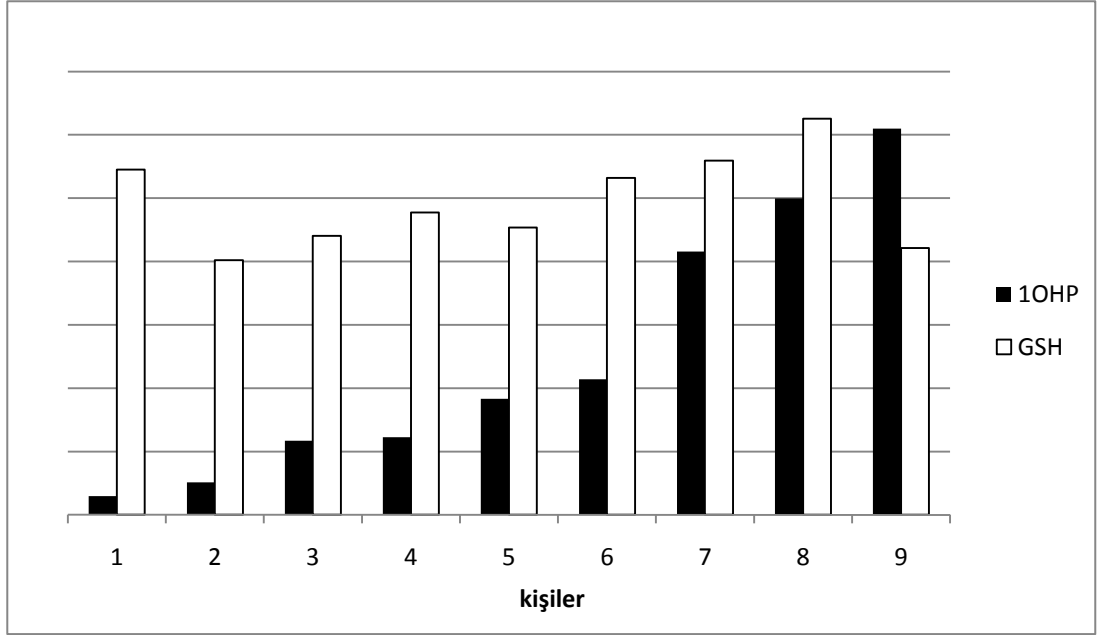


Şekil 3.5. Sigara içen bireylerin plasental glutatyon düzeyleri ile idrar 1-OHP düzeylerinin karşılaştırılması

*GSH düzeyleri 1/10000 oranında küçültülerek grafiğe geçirilmiştir.

Çizelge 3.17. Sigara dumanına maruz kalan bireylerin plasentalarında glutatyon düzeyleri ve idrarlarında 1-OHP düzeyleri

No	Ad soyad	Glutatyon düzeyleri (nmolGSH/ml)	1-OHP düzeyleri (µmol/mol kreatinin)
1	H.T.	1251,32	0,100
2	R.Ü.	842,54	0,122
3	M.A.	1064,36	0,043
4	A.Y.	954,94	0,024
5	T.Ö.	1089,97	0,006
6	S.K.	880,95	0,023
7	M.A.	803,71	0,010
8	G.A.	906,88	0,037
9	D.E.	1118,25	0,083
Ortalama		990,32 ± 148,63	0,05 ± 0,04



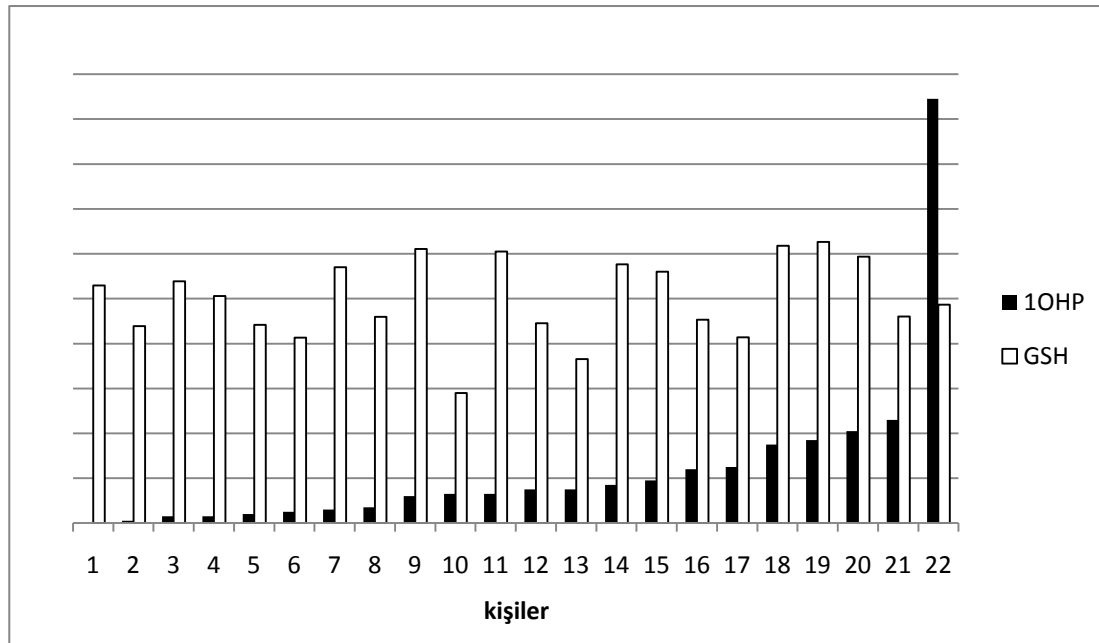
Şekil 3.6. Sigara dumanına maruz kalan bireylerin plasental glutatyon düzeyleri ile idrar 1-OHP düzeylerinin karşılaştırılması

*GSH düzeyleri 1/10000 oranında küçültülerek grafiğe geçirilmiştir

Çizelge 3.18. Sigara içmeyen bireylerin plasentalarında glutatyon düzeyleri ve idrarlarında 1-OHP düzeyleri

No	Ad soyad	Glutatyon düzeyleri (nmolGSH/ml)	1-OHP düzeyleri (µmol/mol kreatinin)
1	S.H.	1253,15	0,037
2	R.M.Y.	1012,16	0,003
3	E.Ö.	906,88	0,024
4	S.S	1187,4	0,041
5	F.G.	877,23	0,001
6	A.T.	919,57	0,007
7	N.B.	891,01	0,015
8	L.K.	1153,65	0,017
9	E.Y.	884,13	0,004
10	M.Ö.	579,36	0,013

11	G.G.	1140,76	0,006
12	D.E.	1210,05	0,013
13	S.G	828,57	0,025
14	Ö.S.	1221,16	0,012
15	S.K.	973,54	0,189
16	G.Ş.C.	731,426	0,015
17	F.D.	1120,88	0,019
18	F.G.	1235,44	0,035
19	Z.D.	1077,77	0,003
20	F.Ç.	826,98	0,005
21	M.G.	921,16	0,046
22	K.G.	1058,23	T.E.
Ortalama		1000,48 ± 180,75	0,024 ± 0,039



Şekil 3.7. Sigara içmeyen bireylerin plasental glutatyon düzeyleri ile idrar 1-OHP düzeylerinin karşılaştırılması

*GSH düzeyleri 1/10000 oranında küçültülerek grafiğe geçirilmiştir

Çizelge 3.19. Çalışmaya katılan bireylerin plasental GSH düzeyleri ile idrar 1-OHP düzeyleri arasındaki korelasyon sonuçları

	n	Korelasyon katsayısı (r)	p
Sigara içenlerde	8	-0,27	> 0,05
Sigara dumanına maruz kalanlarda	9	0,27	> 0,05
Sigara içmeyenlerde	22	0,06	> 0,05
Tümü	39	-0,45	< 0,05

4. TARTIŞMA

Plasentanın temel görevi, gelişmekte olan gebeliğin devamı ve normal fetüs gelişiminin sağlanması için gerekli besleyici molekülleri, iyonları ve gazları anneden fetüse aktarmak, fetüsün metabolizması sonucu oluşan atık ürünlerin maternal dolaşımına geçmesini sağlamaktır (Myatt, 2006).

Gebelik, vücudun metabolik ihtiyaçlarının ve dokuların oksijen gereksiniminin arttığı bir dönemdir. Çalışmalar gebelik döneminde maternal siklusunda lipit peroksitlerin anlamlı olarak arttığını göstermektedir (Sarker ve ark., 1995; Spatling ve ark., 1992). Gebelikte oksidatif stresin major kaynağı plasentadır. Placenta, poliansatüre yağ asitlerinin çok olduğu bir yapıdır, bu yüzden maternal sirkülasyona salgılanan lipit peroksitlerin ana kaynağıdır. Normal gebelikte plasental lipit üretimi plasental antioksidanlar tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Süper oksit dismutaz, katalaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon redüktaz gibi major antioksidan enzimler ve glutatyon gibi enzimatik olmayan antioksidanlar plasentada bulunmaktadır. Sağlıklı gebelikte serbest oksijen radikallerinin üretimi, antioksidan savunma sistemlerinin artmasıyla azalmaktadır.

Serbest oksijen radikallerinin en önemli kaynaklarından biri sigaradır. Gebelikte sigara içilmesi veya ortamdaki sigara dumanının solunması, fertilitiyi, fetüsün gelişmesini, gebeliğin her safhasını, doğumu, bebek sağlığını ve gelişimini etkileyebilmektedir. Sigara içiminin üreme işlevi ve fetüs üzerindeki etkileri günümüzde de yaygın olarak araştırılmaktadır.

Çalışmamıza gebeliğinin 36. haftasını tamamlamış herhangi bir bulaşıcı hastalığı olmayan sağlıklı gebeler dahil edilmiş, erken doğum yapan gebeler çalışma dışı bırakılmıştır. Sigara içen 8, sigara dumanına maruz kalan 9 ve sigara içmeyen 22 gebenin plasentalarında bir antioksidan olan redükte glutatyon düzeyleri ölçülmüştür.

Ayrıca plasenta dokusu alınan bireylerin idrarlarında sigara içiminin veya sigara maruziyetinin göstergesi olan 1-hidroksi piren tayini ve böbrek fonksiyonunun göstergesi olan kreatinin tayini yapılmıştır.

Bu çalışmada öncelikle insan plasentasında GSH düzeyinin saptanması için optimizasyon çalışması yapılmıştır.

Optimizasyon çalışmalarından sonra yapılan örnekleme çalışmalarında ise, sigara içen gebelerin plasental GSH düzeyleri, sigara içmeyen gebelere göre düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sigara içen gebelerin plasental GSH düzeyleri, sigara dumanına maruz kalan gebelere göre düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Fakat sigara içmeyen ve sigara dumanına maruz kalan gebelerin plasental GSH düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Bu bulgular, antioksidanların yetersiz üretilmesi veya antioksidanların daha fazla tüketilmesine neden olan serbest radikallerin artmış olması ile açıklanabilir.

Sigara kullanımının erişkinlerde antioksidan savunma sistemini bozduğuna dair birçok çalışma vardır. Sigara içimine bağlı olarak GSH düzeyinin nasıl etkilendiğine dair yapılan çalışmalar incelendiğinde farklı sonuçların bulunduğu gözlenmiştir. Kan GSH düzeyi sigara içen erişkinlerde daha düşük bulunmuştur (Dinçer ve ark., 2003). Bununla beraber, plazma GSH düzeyinde değişiklik olmadığını (Chavez ve ark., 2007) veya glutatyon düzeyinin sigara içenlerde artmış olduğunu gösteren çalışmalar da (Rahman ve ark., 1996) vardır.

Sigara, plasenta ve fetusta oksidatif strese yol açarak fetusta ve plasentada antioksidan savunma sistemini bozabilmektedir. Sigaranın gebe kadınlar ve bebekleri için oksidatif stres kaynağı olduğunu gösteren ve plasentadaki glutatyon düzeyinin gebelik komplikasyonlarındaki rolünü açıklayabilen birçok çalışma yapılmıştır. Prokopenko ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışmada, çalışma grubunda yer alan erken doğum yapmış gebelerin plasentalarındaki glutatyon seviyesi, kontrol grubunda yer alan zamanında doğum yapmış gebelerin plasentalarındaki glutatyon seviyesinden anlamlı olarak az bulunmuştur. Bu sonuç, serbest radikallerin

plasentada arttığı buna bağlı olarak antioksidan savunma mekanizmasından olan glutasyonun azaldığı ve bu durumun erken doğuma yol açtığı şeklinde yorumlanmıştır.

Miguel Llanos ve arkadaşları çevresel uyarımlarla antioksidan savunma sistemi arasındaki ilişkiyi anlamak için 2009 yılında çalışma yapmışlardır. Gebeliği “fetal gelişme geriliği” ile sonuçlanan ve kontrol grubundaki (gebeliği sağlıklı sonuçlanan) kadınların plasentalarında kadmiyum, kurşun, arsenik ve GSH aktivitesi ölçülmüştür. Cd, As ve Pb seviyeleri gebeliği fetal gelişim geriliği ile sonuçlanan gebelerin plasentalarında anlamlı olarak yüksek bulunurken total GSH düzeyinde için anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Sonuçlar, toksik metallere kaynaklı plasental fonksiyonda hasar oluştuğunu ve bunun fetal gelişim geriliğine sebep olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Zadrozna ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada, gebeliği preterm ve intrauterin gelişim geriliği ile sonuçlanan kadınlar ve sağlıklı gebelik ile sonuçlanan kontrol grubu olmak üzere 3 gruptaki gebelerin plasentalarında selenyum, çinko, bakır ve GSH düzeyleri ölçülmüştür. GSH düzeyi erken doğum yapan gebelerde en az, kontrol grubunda diğer gruplardaki ölçümlerden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu çalışma serbest radikallerin aerobik oksidasyon proseslerini ve savunma mekanizmalarını zayıflattığı şeklinde yorumlanmıştır.

PAH maruziyetinin belirlenmesinde kullanılan birçok biyolojik indikatör olmakla birlikte en çok kullanılan, kabul görmüş indikatörü 1-OHP'dir (Wang ve ark., 2002). Floresans dedektörle kombine yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sigarada bulunan benzopirenin idrardaki metaboliti olan 1-OHP'nin kantitatif tayininde kullanılan başlıca yöntemdir (Jongeneelen ve ark., 1987, Burgaz ve ark., 1998).

HPLC analiz yönteminde 1-OHP ölçümü için 0.2-30 nM konsantrasyon aralığında analitik yöntem validasyonu yapılmıştır. Yöntemin belirtilen kalibrasyon aralığında doğrusal olduğu ($r^2 = 0,99496$) kanıtlanmıştır. Gün arası tekrarlanabilirlik için 0.2, 2,

30 nM olmak üzere 3 farklı düzeyde standart katılan örneklerde yapılan çalışmalarda RSD (%) sırasıyla 8.73, 2.53 ve 1.19; gün içi tekrarlanabilirlik için 0.2, 2, 30 nM olmak üzere 3 farklı düzeyde standart katılan örneklerde yapılan çalışmalarda RSD (%) sırasıyla 3.64, 1.19 ve 0.29; aynı örneklere ait % geri kazanım sonuçları sırasıyla 66.56, 85.01 ve 92.3 olarak bulunmuştur. Yönteme ait tespit limiti (LOD) 0.06 nM, ölçüm alt limiti (LOQ) 0.2 nM olarak belirlenmiştir. 1-OHP analiz sonuçları kreatinin tayini ile düzeltme yapılarak sonuçlar $\mu\text{mol/mol}$ kreatinin cinsinden hesaplanmıştır.

Çalışmamızda sigara içen gebelerin idrarlarında ölçülen 1-OHP düzeyleri, sigara içmeyen gebelere göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sigara içen gebelerin idrarlarında ölçülen 1-OHP düzeyleri, sigara dumanına maruz kalan gebelere göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Fakat sigara içmeyen ve sigara dumanına maruz kalan gebelerin 1-OHP düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi, Li ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları çalışmada sigara içenlerin idrar 1-OHP düzeyleri sigara içmeyenlere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Birçok çalışma sigara içimi ile idrar 1-OHP konsantrasyonu arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Van Rooij ve ark., 1994; Levin 1995).

Ancak çalışmamızda, sigara içen gebelerde ($r = -0,27$, $p > 0,05$), sigara içmeyen gebelerde ($r = 0,06$, $p > 0,05$) ve sigara dumanına maruz kalan gebelerde ($r = 0,27$, $p > 0,05$) plasental GSH düzeyleri ile idrar 1-OHP düzeyleri arasında anlamlı korelasyon bulunmamıştır. Bu sonuçlar, plasental GSH düzeylerindeki azalmaların sadece sigara içimine bağlı olmadığını düşündürmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gebelikte sigara içiminin pek çok olumsuz etkisi bilinmesine rağmen bu konudaki yeni araştırmalar sigaranın bilinmeyen etkilerini ortaya çıkarmak için devam etmektedir. Endojen ve ekzojen kaynaklardan oluşan serbest oksijen radikallerinin gebelik süresince anneyi ve fetusu olumsuz etkilediği ve antioksidan savunma sistemini bozduğu düşünölmektedir.

Yapılan bu çalışmada önemli bir antioksidan olan glutatyon düzeyi plasentada sigara içen gebelerde sigara içmeyenlere göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Sigarada bulunan benzopirenin idrardaki metaboliti olan 1 hidroksi piren seviyesi ise sigara içenlerde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, sigara içen annelerin plasentalarında anlamlı olarak düşük bulduğumuz GSH düzeyini sigaraya bağlı oksidatif stresin bir sonucu olarak düşünmekteyiz.

Bu sonuçlara dayanarak anne adaylarının, gebelikte sigara içiminin hem anneye hem de bebeğe vereceği zararları konusunda sağlık personeli tarafından bilgilendirilmesi ve eğitilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Gebelerin oksidatif strese neden olacak endojen ve ekzojen kaynaklardan uzak durmaları, antioksidan seviyesini arttırmak için beslenme ve yaşam tarzlarına dikkat etmeleri yararlı olacaktır.

Gebelik ve fetusla ilgili yapılan araştırmalarda parametreleri pek çok faktör etkilemektedir. Bu yüzden ilerideki çalışmaların gebe ve fetusun üzerindeki faktörler sabitlenerek daha büyük popülasyonlarda yapılması önerilir. Doğum sonrası bebeklerin durumunun incelenmesinin çalışmaya yararlı bilgiler ilave edeceğini düşünmekteyiz.

ÖZET

Glutasyon (GSH) Düzeyinin Plasentada Araştırılması

Gebelikte sigara kullanmak ya da sigara dumanına maruz kalmak sadece annenin sağlığına zarar vermekle kalmaz, aynı zamanda gebelik ile ilgili komplikasyonların ortaya çıkmasına ve yenidoğanda ciddi sağlık problemlerine yol açmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin en önemli kaynaklarından biri sigaradır. Serbest oksijen radikalleri antioksidanlar aracılığı ile yüksek oranda kontrol altında tutulabilmektedirler. Reaktif oksijen türlerinin uyardığı hasarın engellenmesi için plasentada enzim ve antioksidanları içeren biyokimyasal koruma mekanizmaları mevcuttur. Glutasyon, oksidatif strese karşı koruyucu mekanizmanın temel bir parçasıdır. Oksidatif ve elektrofilik kimyasallara karşı hücrel hedefleri koruyarak koruyuculuk görevini yerine getirmektedir.

Yaptığımız bu çalışmada, sigara içen 8 gebe, sigara dumanına maruz kalan 9 gebe ve sigara içmeyen 22 gebede ölçülen plasental glutasyon seviyeleri sonuçları karşılaştırılarak sigara ile oksidatif stres arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Plasental glutasyon düzeyinin belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem, idrar 1-hidroksi piren düzeyi için floresans dedektörlü HPLC yöntemi kullanılmıştır. HPLC analiz yönteminde 1-OHP için 0.2-30 nM konsantrasyon aralığında analitik yöntem validasyonu yapılmıştır. Yöntemin belirtilen kalibrasyon aralığında doğrusal olduğu ($r^2 = 0,99496$) kanıtlanmıştır. Gün arası tekrarlanabilirlik için 0.2, 2, 30 nM olmak üzere 3 farklı düzeyde standart katılan örneklerde yapılan çalışmalarda RSD (%) sırasıyla 8.73, 2.53 ve 1.19; gün içi tekrarlanabilirlik için 0.2, 2, 30 nM olmak üzere 3 farklı düzeyde standart katılan örneklerde yapılan çalışmalarda RSD (%) sırasıyla 3.64, 1.19 ve 0.29; aynı örneklerle ait % geri kazanım sonuçları sırasıyla 66.56, 85.01 ve 92.3 olarak bulunmuştur. Yönteme ait tespit limiti (LOD) 0.06 nM, ölçüm alt limiti (LOQ) 0.2 nM olarak belirlenmiştir. 1-OHP analiz sonuçları kreatinin tayini ile düzeltme yapılarak sonuçlar $\mu\text{mol/mol}$ kreatinin cinsinden hesaplanmıştır.

Çalışmadan elde edilen sonuçlarda sigara içmeyen gebelerin içenlere göre ve sigara dumanına maruz kalan gebelerin sigara içen gebelere göre plasental GSH düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artma ve idrar 1-OHP düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Sigara içen gebelerin plasental GSH düzeyi ile idrar 1-OHP düzeyi arasında anlamlı korelasyon bulunmamıştır ($r = -0.27$, $p > 0,05$).

Sonuç olarak, sigara içen annelerin plasentalarında anlamlı olarak düşük bulunan GSH düzeyinin sigaraya bağlı oksidatif stresin bir sonucu olduğunu söylemek mümkün olacaktır. Bu çalışmanın sonuçlarının, gebelikte görülebilecek gebelik diyabeti, preeklampsia, fetal gelişim geriliği, erken doğum gibi sorunları kapsayan ileriye dönük çalışmalara katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: glutasyon, oksidatif stres, plasenta, sigara, 1-hidroksi piren

SUMMARY

Investigation of Glutathione (GSH) Level in Placenta

Smoking during pregnancy or exposure to cigarette smoke not only damages health of the mother but also appears the complications related to pregnancy and causes serious health problems in newborns. Cigarette is one of the most important source of oxygen free radicals. Free oxygen radicals can be controlled in high rates by the antioxidants. There is a biochemical protection mechanism that includes enzyme and antioxidants in the placenta and it prevents injury induced by reactive oxygen species. Glutathione is an essential part of protective mechanisms against oxidative stress and makes its protective role via protects cellular targets against oxidative and electrophilic chemicals.

In this study, it is aimed to investigate the relationship between cigarette and oxidative stress to compare results the placental glutathione rates which measures in 8 smoked pregnant women, 9 passive smoked pregnant women and 22 non smoked pregnant women placentas.

Spectrophotometric method for determination of placental glutathione levels and fluorescence detector HPLC method for determination of a 1-hydroxy pyrene in urine were used. The HPLC methods validation were made in 0.2-30 nM concentration range for the 1-OHP. It was demonstrated that method was in a linear calibration range ($r^2 = 0.99496$). It was studied with 3 different levels of standard spiked samples (0.2, 2, 30 nM) to prove inter-day repeatability, intra-day repeatability and recovery. The results of RSD (%) were respectively 8.73, 2.53, 1.19 for inter-day; 3.64, 1.19, 0.29 for intra-day; % 66.56, 85.01, 92.3 for recovery. The method detection limit (LOD) and the lower limit (LOQ) were determined respectively 0.06 nM and 0.2 nM. 1-OHP analysis results were adjusted with creatinine levels and the results were calculated in $\mu\text{mol} / \text{mol creatinine}$.

In this study first of all it was compared that non-smoking pregnant women and smoked pregnant women and than smoke exposure of pregnant women and smoked pregnant women. It was meant that non-smoking pregnant women and smoke exposure pregnant women placental GSH levels significantly increased and urinary 1-OHP levels significantly decreased ($p < 0.05$) to smoked women. Between urinary 1-OHP levels and placental GSH levels were not statistically significant correlation in smoked pregnant women ($r = -0.27$, $p > 0.05$).

As a result, it was shown that oxidative stress were related with cigarette in pregnant women via measured by placental GSH level significantly decreased. It is considered that the results of this research will contribute the studies of the problems during pregnancy, such as pregnancy diabetes, preeclampsia, intrauterine growth restriction and preterm birth.

Key words: Glutathione, oxidative stress, placenta, smoking, 1-hydroxy pyrene

KAYNAKLAR

- ABUJA, P.M., ALBERTINI, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta.*, **306**: 1-17.
- AKERBOOM, T.P.M., SIES, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.*, **77**: 373-382.
- AKKUŞ, İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza yayınları*, 1-47.
- ALP, H., SELİMOĞLU, M.A., YAMAN, S., ENERĞİN, M., ALTINKAYNAK, S., ORBAK, Z. (1995). Gebelikte sigara kullanımının fetüse etkileri. *İstanbul Çocuk Kliniğı Derg*, **30**: 80-83.
- ALTINIŞIK, M. (2000). Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar, Erişim: [<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>].
- AOSHIBA, K., TAMAOKI, J., NAGAI, A. (2001). Acute cigarette smoke exposure induce apoptosis alveolar macrophages. *Am Jphysiol Lung Cell Mol Physiol*, **281**: L 1392-1401.
- AŞUT, O. (1993). Hekim ve Sigara. 1.Baskı, Ankara: *Türk Tabipler Birliğı Yayınları*, Maya Matbaacılık Yayıncılık Ltd.Şti., 45-52.
- BEAUSEJOUR, A., BIBEAU, K., LAVOIE, J.-C., ST-LOUIS, J., BROCHU, M. (2007). Placental oxidative stress in a rat model of preeclampsia. *Placenta*, **28**: 52-58.
- BEKERECİOĞLU, M., UĞRAŞ, S., DİLEK, O.N., TERCAN, M. (1998). Serbest radikaller, temel görüşler, biyokimyası, fizyopatolojisi ve cerrahi ile ilgileri. *Sendrom*, **10**: 85-95.
- BHARATH, S., HSU, M., KAUR, D., RAJAGOPALAN, S., ANDERSEN, J.K. (2002). Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*, **64**: 1037-1048.
- BISWAS, S., RAHMAN, I. (2009). Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol. Aspects Med.*, **30(1-2)**: 60-76.
- BREZNICKI, S., JAKUBOWSKI, M., CZERSKI, B. (1997). Elimination of 1-hydroxypyrene after human volunteer exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int Arch Occup Environ Health*, **70**: 257-260.
- BRIDGES, R.J., MEISTER, A. (1985). γ -glutamyl amino acids. Transport and conversion to 5-oxoproline in the kidney. *J Biol. Chem.*, **260**: 7304-7308.

- BURGAZ, S., ERDEM, O., KARAHALİL, B., KARAKAYA, A.E. (1998). Cytogenetic biomonitoring of workers exposed to bitumen fumes. *Mutat Res*, **419**: 123-130.
- BUSH, P.G., MAYHEW, T.M., ABRAMOVICH, D.R., et al. (2000). A quantitative study on the effects of maternal smoking on placental morphology and cadmium concentration. *Placenta*, **21(2-3)**: 247-256;
- CAMERA, E., PICARDO, M. (2002). Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *Journal of Chr. B.*, **781**: 181-206.
- CHAI, Y.C., ASHRAF, S.S., ROKUTAN, K., JOHNSTON, Jr R.B., THOMAS, J.A. (1994). S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys.*, **310**: 273-281.
- CHATENOUD, L., PARAZZINI, F., DÌ CINTIO, E., ZANCONATO, G., BENZI, G., BORTOLUS, R., La VECCHIA, C. (1998). Paternal and maternal smoking habits before conception and during the first trimester: relation to spontaneous abortion. *Ann Epidemiol.*, **8(8)**: 520-526.
- CHÁVEZ, J., et al. (2007). Effect of cigarette smoking on the oxidant/antioxidant balance in healthy subjects. *American Journal of Therapeutics*, March/April, Volume 14 - Issue 2 - pp 189-193.
- CHETIYANUKORNKUL, T., TORIBA, A., KAMEDA, T., (2006). Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal Bioanal Chem*, **386**: 712–718.
- CNUBBEN, N.H.P., RIETJENS, I.M.C.M., WORTELBOER, H., ZANDEN, J., BLADEREN, P.J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **10**: 141-152.
- COLLIER, A.C., TINGE, M.D., PAXTON, J.W., ET AL. (2002). Metabolizing enzyme localisation and activities in the first trimester human placenta: the effect of maternal and gestational age, smoking and alcohol consumption. *Hum Reprod.*, **17**: 2564-2572.
- CONNER, E.M., GRISHAM, M.B. (1996). Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition*, **12**: 274-277.
- COOKE, M.S., EVANS, M.D., DÍZDAROĞLU, M., LUNEC, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB J.*, **17**: 1195-1214.
- CORNELIUS, M.D., TAYLOR, P.M., GEVA, D., DAY, N.L. (1995). Prenatal tobacco and marijuana use among adolescents: Effects on offspring gestational age, growth, and morphology. *Pediatrics*, **95(5)**: 738-743
- CORREIA, S., NASCIMENTO, C., GOUVEIA, R., MARTINS, S., SANDES, A.R., FIGUEIRA, J., VALENTE, S., ROCHA, E., Da SILVA, L. (2007). Pregnancy and smoking: an opportunity to change behaviours. *Acta Med Port.*, **20(3)**: 201-207.

- CROSS, C. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Medicine*, **107**: 526-545.
- CUI, X.L, BROCKMAN, D., CAMPOS, B. & MYATT, L. (2006). Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia. *Placenta* **27**: 422-431.
- ÇAVDAR, C., SİFİL, A., ÇAMSARI, T. (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, **3-4**: 92-95.
- DELİBAŞ, N., ÖZCANKAYA, R. (1995). Serbest radikaller. *SDÜ Tıp Fak. Derg.*, **2,3**: 11.
- DEMPSEY, D.A., BENOWITZ, N.L. (2001). Risk and benefits of nicotine to aid smoking cessation in pregnancy. *Drug Saf.* **24**: 277-322.
- DESIDERI, A., FALCONI, M. (2003). Prokaryotic Cu, Zn superoxidies dismutases. *Biochem Soc Trans.*, **31**: 1322-1325.
- DICKINSON, D.A., FORMAN, H.J. (2002). Cellular glutathione and thiols methabolism. *Biochemical Pharmacology*, **64**: 1019-1026.
- DiNÇER, Y., SAYGILI, E.İ., AKÇAY, T. (2003). İnfluence of smoking on DNA damage and blood glutathione level. *T Klin J Med Sci.*, **23**: 108-111.
- DİZDAROĞLU, M. (1991). Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med.*, **10**: 225-242.
- DİZDAROĞLU, M., JARUGA, P., BİRİNCİOĞLU, M. (2002). Free radical induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Rad Biol Med.*, **32**: 1102-1115.
- EATON, D.L., BAMMLER, T.K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.* **49**: 156-164
- ELLMAN, G., LYSKO, H. (1979). A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal Biochem.*, **93(1)**: 98-102.
- ENDERS, A.C., BLANKENSHIP, T.N. (1999). Comparative placental structure. *Adv Drug Deliv Rev.*, **38**: 3-16.
- EPE, B. (1992). Genotoxicity of singlet O₂. *Chem. Biol Interact.*, **80**: 239-260.
- FDA. (2001). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation.
- FISHER, E.B., ROST, K. (1996). Smoking cessation: a practical guide for the physicians. *Clin Chest Med*, **7**: 551-565.
- FOLKART, G.R., DANCIS, J., MONYR, W.L. (1960). Transfer of carbohydrates across guinea pig placenta. *Am J Obstet Gynecol.*, **80**: 221-223.

- FORMAN, H.J., FUKUTO, J.M., TORRES, M. (2004). Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am. J. Physiol.*, **287**: 246-256.
- FORMAN, H.J., ZHANG, H., RINNA, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, **30**: 1-12.
- FOWLER, P.A., CASSIE, S., RHIND, S.M., BREWER, M.J., COLLINSON, J.M., LEA, R.G., BAKER, P.J., BHATTACHARYA, S., O'SHAUGHNESSY, P.J. (2007). Maternal smoking during pregnancy specifically reduces human fetal Desert hedgehog gene expression during testis development. *J Clin Endocrinol Metab.* 13.
- FRATERNATE, A., PAOLETTI, A.F., et al. (2009). GSH and analogs as antiviral drugs. *Mol. Aspects Med.*, **30(1-2)**: 99-110.
- FRIDOWICH, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, **201**: 875-877.
- GENÇ, H. (2008). Fetal plasentasyon aşamasında serum prostanoid ve lipid hidroperoksid düzeylerinin preeklampsi gelişimiyle ilişkisinin incelenmesi. Uzmanlık tezi, İstanbul Üniv.
- GRIFFITH, O.W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**: 922-935.
- GUPTA, M., DOBASHI, K., GREENE, E.L., ORAK, J.K., SINGH, I. (1997). Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat sub-cellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem.*, **176**: 337-347
- GUTTERIDGE, J.M.C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chemistry*, **41**: 1819-1828.
- HAHN, T., DESOYE G. (1996). Ontogeny of glucose transport systems in the placenta and its progenitor tissues. *Early Preg Biol Med.* **2**: 168-182.
- HALL, M., GROVER, P.L. (1990). Chemical carcinogenesis and mutagenesis I. In: Cooper CS, Grover PL (eds), Springer, Heidelberg, pp 327-359.
- HALLIWELL, B. (1991). Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med.*, **91**: 14-21.
- HALLIWELL, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease. *Lancet*, **344**: 721-724.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. *3rd edn. Oxford: Oxford Science Publications.*
- HAROUN, L., DUNN, A.J., TING D. (2004). Chapter 2. Exposure measurement and prevalence. National Cancer Institute Smoking and Tobacco Control Monograph 10: Health Effects of Exposure to Environmental Tobacco Smoke.

- HILL, M.D., ABRAMSON, F.P. (1988). The significance of plasma protein binding on the fetal/maternal distribution of drugs at steady-state. *Clin Pharmacokinet.*, **14**: 156-170.
- HOLBROOK, J.H. (1991). Tobacco. In: Wilson JD., eds. Principles of Internal Medicine. Newyork: *Mc Graw Hill*, 2158-2161.
- HUANG, C.S., CHANG, L.S., et al. (1993). Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney g-glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.*, **268**: 19675–19680.
- HUANG, K.P., HUANG, F.L. (2002). Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide. *Biochem. Pharmacol.*, **64(5-6)**: 1049–1056.
- IARC (1983). Monographs on the evulation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, vol 32. Polynuclear aromatic compounds: part I cnemical, environmental and experimental data. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- INOUE, M., SATO, E.F., NISHIKAWA, M., PARK, A.M., KIRA, Y., IMADA, I., UTSUMI, K. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem.*, **10**: 2495-2505.
- JOHANSSON, M., GLAZIER, J.D., SIBLEY, C.P., JANSSON, T., POWELL, T.L. (2002). Activity and protein expression of the Na⁺/H⁺ exchanger is reduced in syncytiotrophoblast microvillous plasma membranes isolated from preterm intrauterine growth restriction pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.*, **87(12)**: 5686-5694.
- JONES, D.P. (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol.*, **348**: 93-112.
- JONGENEELLEN, F.J., ANZION, R.B., HENDERSON, P.T. (1987). Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J. Chromotogr.*, **413**: 227-232.
- JONGENEELLEN, F.J., BOS, R.P. (1990). Excretion of pyrene and hydroxypyrene in urine. *Cancer Lett.*, **51**: 175-179.
- JOSEPHY, P.D., MANNERVIK, B. (2006). Molecular toxicology. Second edition.
- KALINKA, J., HANKE, W. (1996). Tobacco smoking-a risk factor for intrauterine growth retardation, preterm delivery and low birth weight. *Ginekol Pol.*, **67(2)**: 75-81.
- KAMINSKY, L.M., ANANTH, C.V., PRASAD, V., NATH, C., VINTZILEOS, A.M. (2007). New Jersey Placental Abrupton Study Investigators. The influence of maternal cigarette smoking on placental pathology in pregnancies complicated by abrupton. *Am J Obstet Gynecol.*, **197(3)**: 275.
- KARABULUT, B., KABAKÇI, T. (1995). Serbest radikaller. *Akademi*, **1**: 28-35.

- KAUFMANN, P., SCHEFFEN, I. (1992). Placental development. In: Polin RA, Fox WW, editors. *Fetal and neonatal physiology*, 47-56.
- KAVAS, G.Ö. (1989). Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri*, **9(1)**: 1-8.
- KETTERER, B. (1986). Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica*, **16 (10-11)**: 957-973.
- KONUKOĞLU, D., AKÇAY, T. (1995). Glutatyon metabolizması ve klinik önemi. *T Klin Tıp Bilimleri*, **15**: 214-218.
- KUMARAGRUPAN, R., SUBAPRIYA, R., VISWANATHON, P. (2002). Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clin. Chim. Acta.*, **325**: 165-170.
- LARSEN, L.G., CLAUSEN, H.V., JONSSON, L. (2002). Stereologic examination of placentas from mothers who smoke during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.*, **186(3)**: 531-537.
- LAWRENCE, R.A., BURK, R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Communi.*, **71(4)**: 952-958.
- LEVIN, J.O. (1995). First international workshop on hydroxypyrene as a biomarker for PAH exposure in man-summary and conclusions. *Sci Total Environ*, 163: 165–168
- LEWIS, S.H., GILBERT-BARNES, E. (1998). The placenta and its significance in neonatal outcome. *Advances in Pediatrics*, 45: 223-265.
- LI, H., KRIEGER, R.I., LI, Q.X. (2000). Improved HPLC method for analysis of 1-hydroxypyrene in human urine specimens of cigarette smokers. *The science of total environment*, **257**: 147-153
- LIOCHEV, S.I., FRIDOVICH, I. (2002). The Haber-Weiss cycle – 70 years later: an alternative view. *Redox report*, 7: 55-57.
- LLANOS, M., RONCO, A.M. (2009). Fetal growth restriction is related to placental levels of cadmium, lead and arsenic but not with antioxidant activities. *Reproductive Toxicology*, **27**: 88-92.
- LU, S.C. (2000). Regulation of glutathione synthesis. *Curr. Top. Cell Regul.*, 36: 95–116.
- LUKE, S.T., (2007). Placental development and functions. Erişim : [http://staff.um.edu.mt/csav1/sho_course/2.pdf].
- MACKAY, J., ERIKSEN, M. (2002). The Tobacco Atlas. Geneva. World Health Organization.

- MARAKOĞLU, K., SEZER, R.E. (2003). Sivas'ta Gebelikte Sigara Kullanımı. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **25**: 157-164.
- MARAKOĞLU, K., KUTLU, R., SAHSIVAR, S. (2006). The frequency of smoking, quitting and socio-demographic characteristics of physicians of a medical faculty. *West Indian Med J*. **55(3)**: 160-64.
- MARCK, D.D., ZIMMER, A. (1967). Clinical chemistry, Vol 1, atlas of clinical laboratory procedures. *McGraw-Hill Book Company*, Newyork, pp 62.
- MARRAY, M. (1992). P-450-enzymes-inhibition mechanisms, genetik regulation and effects of liver disease. *Clin Pharmacokinet*, **23**:132-146.
- MARUOKA, K., YAGI, M., AKAZWA, K., KINUKAWA, N., UEDA, K., NOSE, Y. (1998). Risk factors for low birth weight in Japanese infants. *Acta Paediatr.*, **87(3)**: 304-309.
- MATES, J.M., PEREZ-GOMEZ, C., de CASTRO, I.N. (1999). Antioxidant enzymes and human disease. *Clin Biochem.*, **32**: 595-603.
- MCFARLANE, J., PARKER, B., SOEKEN, K. (1996). Physical abuse, smoking, and effects on birth weight. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.*, **25(4)**: 313-320.
- MEISTER, A. (1992). Biosynthesis and function of glutathione, an essential biofactor. *J. Nutrit. Sci. Vitaminol.*, Spec No: 1-6.
- MEISTER, A. (1995). Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.*, **251**: 3-7.
- MEISTER, A., ANDERSON, M.E. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem.*, **52**: 711-760.
- MEISTER, A., LARSSON, A. (1989). Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the g-glutamyl cycle. The metabolic basis of inherited disease. *6th ed. New York: McGraw-Hill*, 855-868.
- MERAM, İ., AKTARAN, Ş. (2002). Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri. *Arşiv*, **11**: 299.
- MIYAO, M., FURUTA, M., MATSUSHITA, Y., OGISO, M., ISHIHARA, S., TEO, P.C. (1995). A matched-pair longitudinal study on the relationship between maternal smoking and head circumference of newborns. *Tohoku J Exp Med.*, **175(2)**: 135-137.
- MORI, T., TANO, K., TAKIMOTO, K., UTSUMI, H. (1998). Formation of 8- hydroxyguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine in DNA by riboflavin mediated photosensitization. *Biochem Biophys Res Commun.*, **242**: 98-101.
- MULDER, T.P., MANI, J.J., ROELOFS, H.M., PETERS, W.H., WIERSMA, A. (1995). Glutathione peroxidases in human head and neck cancer. *Acta otolaryngol.*, **115**: 331-333.

- MURPHY, R.C., ZARINI, S. (2002). Glutathione adducts of oxyeicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **68-69**: 471-482.
- MUSCATI, S.K., GRAY-DONALD, K., NEWSON, E.E. (1994). Interaction of smoking and maternal weight status in influencing infant size. *Can J Public Health.*, **85(6)**: 407-412.
- MYATT, L. (2006). Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol.*, 25-30.
- MYATT, L., CUI, X. (2004). Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.*, **122**: 369-382.
- MYLLYNNEN, P., PASANEN, M., PELKONEN, O. (2005). Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta*, **26**: 361-371.
- NAKAGAWA, Y., FUJIMOTO, J., TAMAYA, T. (2004). Placental growth factor by the estrogen-dependent angiogenic growth factors, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor, throughout gestation. *Gynecol Endocrinology*, **19**: 259-266.
- NAPOLI, C., IGNARRO, L.J. (2003). Nitric oxide-releasing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **43**: 97-123.
- NAU, H. (1992). Physicochemical and structural properties regulating placental drug transfer. *Fetal and neonatal physiology*, 130-141.
- NELSON, D.M., SMITH, S.D., FURESZ, T.C, SADOVSKY, Y., GANAPATHY, V., PARVIN, C.A., SMITH, C.H. (2003). Hypoxia reduces expression and function of system A amino acid transporters in cultured term human trophoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.*, **284**: 310-315.
- NGUYEN, T., SHERRATT, P.J., PICKETT, C.B. (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **43**: 233-260.
- NIKI, E., YOSHIDA, Y., SAITO, Y., NOGUCHI, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **338**: 668-676.
- NJALSSON, R., CARLSSON, K., et al. (2000). Kinetic properties of missense mutations in patients with glutathione synthetase deficiency. *Biochem. J.*, **349**: 275-279.
- NORDBERG, J., ARNER, E.S.J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants and mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine.*, **31,11**: 1287-1312.
- NORONHA-DUTRA, A.A., EPPERLEIN, M.M., WOOLF, N. (1993). Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing. *FEBS Lett.*, Apr **19**; **321(1)**: 59-62.

- NYSKA, A., KOHEN, R. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stres phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.*, **30**: 620-650.
- ÖZKAN, A., FIŞKIN, K. (2004). Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, **14**: 52-60.
- ÖZSOY, S. (1992). Gebelikte sigara içme alışkanlığı ve evde sigara içilmesinin doğum şekli ve bebeğin doğum tartısı üzerine etkisi. *Hemşirelik Bülteni*, **6**: 25-26.
- ÖZŞEKER, F., BARAN, A., TUNCER, L.Y., ve ark. (2004). Tüberkülozlu hastalarda sigara içme alışkanlığı. Toraks Derneği 7.yıllık kongresi, 28 Nisan - 1 Mayıs, Antalya
- ÖZYARDIMCI, N. (2002). Sigara ve sağlık. Bursa.
- PACHER, P., BECKMAN, J.S., LIAUDET, L. (2007). Nitric oxide and peroxyntirite in health and disease. *Physiol Rev.*, **87(1)**: 315-424.
- PACIFICI, G.M., NOTTOLI, R. (1995). Placental transfer of drugs administered to the mother. *Clin Pharmacokinet.*, **28(3)**: 235-269.
- PASANEN, M., PELKONEN, O. (1994). The expression and environmental regulation of P450 enzymes in human placenta. *Crit Rev Toxicol.*, **24**: 211-229.
- PASTOREA, A., FEDERICIA, G., BERTINIB, E., PIEMONTE, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta.*, **333**: 19-39.
- PEACOCK, J.L., BLAND, J.M., ANDERSON, H.R. (1995). Preterm delivery: effects of economic factors, stres, smoking, alcohol, and caffeine. *BMJ* 26, **311(7004)**: 531-535.
- PEEREBOOM, J.H., NOORDHOEK, J., et al. (1998). Mechanisms of drug transfer across the placenta. *Pharm World Sci.*, **20**: 139-148.
- PERKINS, A.V., (2006). Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, **46**: 77-83.
- PETRAGLIA, F. et al (1992). Gonadotropin-Releasing Hormono. Inhibin and Activin in Human Placenta: Evidence for a Common Cellular Localization. *Clinical Endocrinology and Metabolizm*, 0021-972X/92/7404-1184.
- POSTMUS, P.E. (1998). Epidemiology of Lung Cancer in: Fishmans Pulmonary Diseases and Disorders. 3th ed. (Ed: Fishman AP. Elias JA. Fishman JA. Grippi MA. Kaiser LR. Senior RM) USA. The McGraw-Hill Companies, 1706-1725.
- PROKOPENKO, V.M., PARTSALIS, G.K., PAVLOVA, N.G., BURMISTROV, S.O., ARUTYUNYAN, A.V. (1998). Glutathione-dependent system of antioxidant defense

in the placenta in preterm delivery. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, No. 5, 2002. *General Pathology and Pathological Physiology*.

- PULLAR, J.M., VISSERS, M.C., et al. (2000). Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells. *IUBMB Life*, **50(4-5)**: 259-266.
- RADI, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci*, **101(12)**: 4003-4008.
- RAHMAN, I., MacNEE, W. (1996). Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, **51**: 348-350.
- REED, D.J. (2000). Mechanisms of chemically induced cell injury and cellular protection, (E. Hodgson; R.C. Smart, Editörler). *Introduction to Biochemical Toxicology*. Wiley and Sons Inc., United States of America, 221-253.
- REED, D.J., FARISS, M.W. (1994). Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev.*, **36**: 235-335.
- RICHMAN, P.G., MEISTER, A. (1975). Regulation of gamma-glutamylcystein synthetase b nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem.*, **250**: 1422.
- ROBERTS, V.H., SMITH, J., MCLEA, S.A., HEIZER, A.B., RICHARDSON, J.L., MYATT, L. (2009). Effect of increasing maternal body mass index on oxidative and nitrative stress in the human placenta. *Placenta*, **30(2)**: 169–175.
- ROSSI, R., MILZANI, A., DALLE-DONNE, I., et al. (2002). Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin Chem.*, **48**: 742-753.
- ROUM, J.H., BUHL, R., et al. (1993). Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J. Appl. Physiol.*, **75**: 2419-2424.
- SAMIEC, P.S., DAHM, L.J., JONES, D.P. (2000). Glutathione S-transferase in mucus of rat small intestine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **140**: 1-12.
- SANIN, L.H., LOPEZ, S.R. (2001). Relation Between Birth Weight and Placenta Weight. *Biology of the Neonate*, **80**: 113–111.
- SARKER, A.H., WATANABE, S., SEKI, S., AKIYAMA, T., OKADA, S. (1995). Oxygen radical-induced single-strand DNA breaks and repair of the damage in a cell free system. *Mutat Res.*, **337**: 85-95.
- SCHIERL, R. (2000). Environmental monitoring of platinum in air and urine. *Microchemical Journal*, **67**: 245-248.

- SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. (1968). Estimation of total protein-bound and non protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.*, **25**: 192-205.
- SEEDS, A.E. (1968). Placental transfer, intrauterine development. *Early Pregnancy*, **2**: 103-128.
- SEN, C.K. (1997). Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **8**: 660-672.
- SERAFINI, M., DEL RIO, D. (2004). Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool. *Redox Report*, **9(3)**: 145-152.
- SHAH, V.P., MIDHA, K.K. (1992). Bioanalytical Method Validation: Bioequivalence/Bioavailability and Pharmacokinetics Studies. *Pharmaceutical Research*, **9**.
- SHAH, V.P. et al. (2000). Bioanalytical Method Validation – A Review with a decade of progress. *Pharmaceutical Research*, **17**: 1551-1557.
- SMITH, C.H., MOE, A.J., GANAPATHY, V. (1992). Nutrient transport pathways across the epithelium of the placenta. *Annu Rev Nutr.*, **12**: 183-206.
- SPATLING, L., FALLENSTEIN, F., HUCH, A. (1992). The variability of cardiopulmonary adaptation to pregnancy at rest and during exercise. *Br Obst Gynecol*, **99**: 1-40.
- STADTMAN, E.R. (2004). Role of oxidants species in aging. *Curr Med Chem.*, **11**: 1112-1150.
- SURGEON GENERAL (2004). The health consequences of smoking: a report of the surgeon general. Erişim: [<http://www.surgeongeneral.gov/library/smokingconsequences>].
- SWARTZ, M.E., KRULL, I.S. (1997). Analytical Method Development and Validation. USA, New York: Marcel Dekker Inc.
- SYME, M.R., PAXTON, W., KEELAN, J.A. (2004). Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet.*, **43(8)**: 487-514.
- UNCU, Y.A. (1999). Gebelikte asemptomatik bakteriüri sıklığı ve gebelik komplikasyonları ile ilişkisi. Uzmanlık tezi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği AD*. Bursa.
- ÜNAL, A. (2007). Üriner sistem kanser hastalarında cerrahi tedavi öncesi ve sonrası idrar 8-hidroksideoksiguanozun seviyeleri. Doktora Tezi, Gazi Üniv Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- ÜSTÜN, C., MALATYALIOĞLU, E. (1990). Gebelikte sigara kullanımının fetüs ve plasenta üzerine etkileri. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **7**: 43-48.
- VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Inter.*, **160**: 1-40.

- VAN ROOIJ, J.G.M., VEEGER, M.M.S., BODELIER-BADE, M.M., SCHEEPERS, P.T.J., JONGENEELLEN, F.J. (1994). Smoking and dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons as sources of interindividual variability in the baseline excretion of 1-hydroxypyrene in urine. *Int Arch Occup Environ Health*, **66**: 55–65.
- VAN SCHOOTEN, F.J., JONGENEELLEN, F.J., HILLEBRAND, M.J. (1995). Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cell DNA and 1-hydroxypyrene in the urine from aluminum workers: Relation with job category and synergistic effect of smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **4**: 69-77.
- VENGLARIK, C.J., GIRON-CALLE, J., et al. (2003). Hypochlorous acid alters bronchial epithelial cell membrane properties and prevention by extracellular glutathione. *J. Appl. Physiol.*, **95(6)**: 2444-2452.
- VERKERK, P.H., BUITENDIJK, S.E., VERLOVEE-VANHORICK, S.P. (1994). Differential misclassification of alcohol and cigarette consumption by pregnancy outcome. *Int J Epidemiol.*, **23 (6)**: 1218-1225.
- VIGNAIS, P.V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol. Life Sci.*, **59(9)**: 1428–1459.
- WANG, X.L., TAO, S., DAWSON, R.W., XU, F.L. (2002). Characterizing and comparing risks of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Tianjin wastewater-irrigated area. *Environ Res*, **90**: 201-206.
- WHO; (1997), Tobacco or Health in Turkey. Repeat of a WHO mission to Ankara, Turkey.
- WINTERBOURN, C.C., BRENNAN, S.O. (1997). Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem. J.*, **326**: 87-92.
- WU, D., CEDERBAUM, A.I. (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health*, **27(4)**: 277-284.
- WU, G., FANG, Y.Z., YANG, S., LUPTON, J.R., TURNER, N.D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*, **134**: 489-492.
- YOUNG, I.S., WOODSIDE, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.*, **54**: 176-186.
- YUAN, L., KAPLOWITZ, N. (2009). Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol. Aspects Med.*, **30(1–2)**: 29-41.
- YURDAKUL, Z. (2003). Canlılar ve Oksijen. *Klinik Biyokimya seminer notları*.
- ZADROZNA, M. et al. (2009). Antioxidants activities and concentration of selenium, zinc and copper in preterm and IUGR human placentas. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **23**.

EK 1

.../.../2009

Glutasyon (GSH) düzeyinin plasentada ölçümü için anket formu

Adı ve Soyadı :			
Yaşı :		Doğum Yeri :	
Yaşadığı Yer :			
Mesleği :			
Kaç çocuğa sahip :			
Doğum nasıl gerçekleşti :	<input type="checkbox"/> Normal Doğum <input type="checkbox"/> Sezeryan		
Doğum hamileliğin kaçınıcı haftasında oldu :			
Çocuğun cinsiyeti :	<input type="checkbox"/> Kız <input type="checkbox"/> Erkek		
Sigara kullanıyor mu :	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır		
Cevap evet ise günde kaç adet :		En son sigarayı kaç saat önce kullandığı	
Aile bireylerinde veya sizde herhangi bir genetik hastalık var mı :			
Hamilelik süresince ilaç kullandı mı :	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır		
Cevap evet ise hangi ilaçlar			
Ev telefonu :		Cep telefonu :	
Adresi :			

EK 2

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir çalışma olup, çalışmanın adı “Glutasyon (GSH) Düzeyinin Plasentada Araştırılması”dır.

Gebelikte sigara kullanımı sonucu bebeği koruyacak sistemin bozulmasıyla sizde ve bebeğinizde olumsuzluklar oluşabilecektir. Hamilelik süresince oluşan, bebeğin gelişimi için gerekli koşulu sağlayan, “plasenta” olarak adlandırılan ve bebe eşisi olarak da bilinen parça doğum esnasında bebek ile dışarı atılır. Plasentada bebeği koruyacak koruyucu sistemler vardır. Bu koruyucu sistemlerin bozulması, dışarıdan gelecek zararlı bir maddeye karşı bebeğin olumsuz etkilenmesine neden olur. Bu çalışma sigara içmeyen gebelerin sigara içen gebelere göre bebeklerini ne kadar daha iyi koruduklarını göstermek amaçlı yapılmaktadır.

Bu araştırmada sizden sadece plasenta ve idrar örnekleri alınacaktır. Plasenta zaten doğum esnasında bebekle birlikte sizden atılacağı için plasentanın alımı size fazladan bir rahatsızlık veya risk getirmeyecektir. Sizden alınacak olan idrar ve plasenta örnekleri sadece bu çalışma için kullanılacak olup deney sonrasında tıbbi atık olarak imha edilecektir. Bu işlemler sırasında zorlayıcı veya acı veren herhangi bir uygulama olmayacaktır. Araştırmaya bağlı bir zarar söz konusu değildir. Bu araştırmada yer almanız için bize 15 dakika ayırmanız yeterli olacaktır. Size kısa cevaplar vereceğiniz sorular sorulacaktır, siz de bu soruları cevaplayacaksınız. Sorularımıza doğru cevap vermeniz çalışmamızın doğruluğu açısından önemlidir. Bu çalışmaya katılmaya karar verdikten sonra, anket formunu doldurmak, idrar vermek ve bu formu imzalamak sizin sorumluluklarınızdır. Bu çalışmaya yaklaşık 60 gönüllü gebenin katılması planlanmaktadır.

Araştırmaya katıldığınız için size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum

herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Bu araştırma tez amaçlı yapıldığı için size daha sonrasında bir bilgilendirme yapılmayacaktır. Sizin için bu çalışmanın beklenen bir yararı yoktur. Fakat sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda bunu size derhal bildireceğiz. Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu araştırma Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Toksikoloji Anabilim Dalı tarafından desteklenmektedir.

Araştırma ile ilgili herhangi bir soru veya sorunuz olduğunda, ek bilgi almak istediğinizde bu açıklamaları size yapan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi yüksek lisans öğrencisi olan Eczacı Yelda Kasap'a 0312 309 11 41 nolu telefondan ulaşabilirsiniz.

Araştırmaya katılmak isterseniz bu formu imzalayınız.

Katılımınız için teşekkürler.

Sorumlu Araştırmacı : Prof. Dr. Benay Can Eke

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Toksikoloji Anabilim Dalı

Tel : (0312) 2031317 e-mail : eke@pharmacy.ankara.edu.tr

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı: Yelda Kasap

Görevi: Eczacı

Adresi: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Toksikoloji Anabilim Dalı

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza

EK 3

KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	ANKARA 1 NOLU KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	PINARBAŞI MAHALLESİ ARDAHAN SOKAK NO:25 KEÇİÖREN /ANKARA
TELEFON	0312 356 90 31-0312 356 90 00 / 2054-1146
FAKS	0312 356 90 31
E-POSTA	keahetikkurul@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Glutasyon (GSH) düzeyinin plasentada araştırılması		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU			
	EUDRACT NUMARASI			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Benay CAN EKE		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Toksikoloji		
	KOORDİNATORUN ÜNVANI/ADI/SOYADI			
	KOORDİNATORUN UZMANLIK ALANI			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi		
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Toksikoloji A.D. 06100 Tandoğan ANKARA		
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	ANKARA 1 NOLU KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input checked="" type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	
FAZ 2		<input type="checkbox"/>		
FAZ 3		<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>		
BE/BY		<input type="checkbox"/>		
DIĞER		<input type="checkbox"/>	Diğer ise belirtiniz:	
İLAC DIŞI ARAŞTIRMA		<input checked="" type="checkbox"/>	Belirtiniz: Deneysel Karşılaştirmalı	
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	04.09.2009		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŐURÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŐ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	04.09.2009		Türkçe <input checked="" 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"/>

Belge Adı		Açıklama
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	
SİĞORTA	<input type="checkbox"/>	
HASTA KARTI/GÜNÜKLİKLERİ	<input type="checkbox"/>	
İLÂN	<input type="checkbox"/>	
YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	

SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>
GUVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>
DİĞER	<input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2009/24.33	Tarih: 30.09.2009
	Prof. Dr. Benay CAN EKE sorumluluğunda yapılması tasarılan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına / bulunduğuna ve Kurulumuz kararının başvuru sahibi tarafından Sağlık Bakanlığı'na arzına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik , İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu, ve Etik Kurul SOP
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Uz.Dr. K.Okhan AKIN	
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Uz.Dr.K.Okhan AKIN-BAŞ.	Biyokimya	K.E.A.H.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uz.Dr.H.Ekmel OLCAY BAŞ.YRD.	Farmakoloji	R.S.H.M.B.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Deniz ERBAŞ-ÜYE	Fizyoloji	G.Ü.T.F.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr. Meral TUNÇBİLEK-ÜYE	Farmasötik Kimya	A.Ü.E.F.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Mustafa N.İLHAN-ÜYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç.Dr.Serap ŞAHİNOĞLU-ÜYE	Deontolog	A.Ü.T.F.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç.Dr.Mehmet Fatih TAŞAR-ÜYE	Eğitim	G.Ü.E.F.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Uz.Dr.Ayşe Serap KARADAĞ-ÜYE	Cildiye	K.E.A.H.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uz. Dr. Şamil HIZLI-ÜYE	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	K.E.A.H.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uz. Dr. Baran ACAR-ÜYE	K.B.B.	K.E.A.H.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Ecz.Neriman BULUT-ÜYE		K.E.A.H.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Av.Nazmiye DOĞAN-ÜYE	Hukuk	R.S.H.M.B.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Fersin KESKİN-ÜYE	İstatistik	H.Ü.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
			E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
			E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Yelda
 Soyadı: KASAP
 Doğum yeri ve tarihi: Mersin, 1984
 Uyuşu: TC
 Medeni durumu: Bekar
 İletişim adresi ve telefonu: İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü
 Çankırı Cad. No:57 Dışkapı, Ankara Tel: 312-3091141

II- Eğitimi:

2003-2007 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
 1996-2003 Silifke Anadolu Lisesi

Yabancı Dil: İngilizce

III- Ünvanları:

Eczacı

IV- Mesleki Deneyimi:

2008-.. İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü,
 (İlaç Güvenliği İzleme, Değerlendirme Şube
 Müdürlüğü, Türkiye Farmakovijilans Merkezi)
 2006 Yaz Stajı: Hacettepe Hastane Eczanesi, Stajer Ecz.
 2005 Yaz Stajı: Yerlikaya Eczanesi, Stajer Ecz.
 2004 Yaz Stajı: Soldan Eczanesi, Stajer Ecz.

VI- Bilimsel İlgi Alanları: Farmakovijilans, ilaç yan etkileri

VII- Bilimsel Etkinlikleri:

“Serbest Eczacılara Yönelik Farmakovijilans Eğitimi” Kursu (8–9 Kasım 2008)
 “Farmakovijilans İrtibat Noktası Eğitimi” semineri (19 Aralık 2008)
 “Pharmacovigilance and Medical Product Safety” Vienna School of Clinical Research (22-
 23 Aralık 2008)
 “7. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi” (30 Mayıs - 1 Haziran 2009)

VIII-Verdiği konferans ya da seminerler

“Farmakovijilans Denetim” Semineri (7 Mayıs 2009)
 “Farmakovijilans Eğitim ve Sertifikasyon Toplantısı” (24–25 Şubat 2010)