

T.C
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİMDALI
NEONATOLOJİ BİLİM DALI

ANNE SÜTÜNE D VİTAMİNİ EKLENMESİNİN
SAKLAMA SÜRECİNDE TOTAL ANTİOKSİDAN SEVİYE TOTAL
OKSİDAN SEVİYE VE PARAOKSONAZ DÜZEYİNE ETKİSİ

DR. MURAT MİNİCİ
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. RAHMİ ÖRS

KONYA, 2013

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEONATOLOJİ BİLİM DALI

ANNE SÜTÜNE D VİTAMİNİ EKLENMESİNİN
SAKLAMA SÜRECİNDE TOTAL ANTİOKSİDAN SEVİYE TOTAL
OKSİDAN SEVİYE VE PARAOKSONAZ DÜZEYİNE ETKİSİ

DR. MURATMİNİCİ
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. RAHMİ ÖRS

KONYA, 2013

ÖNSÖZ

Tez çalışmasının her aşamasında birlikte çalıştığım, her türlü yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Rahmi ÖRS,

Doç. Dr.Aysun Toker hocam ve değerli ağabeyim Uzm. Dr. Murat Konak'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sabır ve anlayışla her zaman yanımda olan, bu günlere gelmemi sağlayan, sevgilerini ve desteklerini benden asla esirgemeyen biricik eşim, canım annem, babam ve kardeşime

Dostluk ve yardımlarından dolayı asistan arkadaşlarıma ve asistanlığım süresince bilgilerinden yararlandığım, hocalarım ve pediatri uzman hekimlerine,

En içten duygularla sevgi ve saygılarımı sunarım.

Dr. Murat Minici

Aralık –2013

ÖZET

ANNE SÜTÜNE D VİTAMİNİ EKLENMESİNİN SAKLAMA SÜRECİNDE TOTAL ANTİOKSİDAN SEVİYE TOTAL OKSİDAN SEVİYE VE PARAOKSONAZ DÜZEYİNE ETKİSİ

Dr. Murat MİNİCİ, UZMANLIK TEZİ, KONYA, 2013. Amaç: Taze ve dondurulmuş anne sütünde Total Antioksidan Aktivite (TAS), Total Oksidan Aktivite (TOS) ve Paraoksonaz-1 (PON-1) düzeyine bakmak. Antioksidan etkisi olan D vitamininin Anne sütüne eklenmesinin TAS, TOS ve PON-1 üzerine etkisini araştırmak.

Yöntem: Annelerden doğumdan sonra 5 ile 15.(geçiş sütü) günlerde aynı gün ve 1 saat içinde sabah ilk sütleri sağılarak 10 cc alındı. Taze anne sütünde TAS, TOS ve PON-1 düzeyine bakıldı. Anne sütü D vitamini eklenmeden ve 800 Ü D vitamini (6 damla Devit-3) eklenerek -20°C ve -80°C' de 72 saat saklanmak üzere ayrıldı. Ayrılan anne sütünde 72 saat saklama döneminden sonra TAS, TOS ve PON-1 düzeylerine bakıldı.

Bulgular: D vitamini eklenen anne sütünde TAS düzeyi taze anne sütündeki düzeye göre istatistiksel olarak çok anlamlı düşme gösterdi (p=0.001). D vitamini eklenmeden saklanan -80°C'deki anne sütündeki TAS düzeyinde -20°C'de saklanan anne sütüne göre daha az düşme görüldü.

D vitamini eklenmeden saklanan anne sütlerindeki TOS değerlerinde -80°C'de saklanma durumunda D vitamini eklenen anne sütüne göre istatistiksel olarak çok anlamlı düşme görüldü (p=0.001). D vitamini eklenen -80°C deki anne sütünde TOS düzeyinde istatistiksel olarak çok anlamlı artış saptandı (p=0.002). D vitamini eklenmeden -20°C ve -80°C' de saklanan anne sütleri karşılaştırıldığında -80°C' de saklanan sütte TOS değeri istatistiksel olarak çok anlamlı düşük bulundu (0.028).

Taze anne sütü ile karşılaştırıldığında D vitamini eklenen anne sütünde PON-1 değerlerinde eklenmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı düşme gözlemlendi (p=0.021). D vitamini eklenmeden saklanan anne sütünde PON-1 değerleri -80°C de saklanan anne sütünde -20°C'ye göre düşme gösterdi (p=0.021).

Sonuçlar: Taze anne sütünde antioksidan aktivite en yüksek düzeydedir. Anne sütüne D vitamin eklenmesi ile antioksidan aktivitede artış sağlanmamıştır aksine oksidatif stres oranının arttığı tespit edildi. Anne sütüne D vitamini eklenmeden -80°C' de saklamanın -20°C'de saklamadan daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

Bu tez Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 131518007 proje numarası ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

The Effect of storage temperatures and adding Vitamin D into Human Milk on Total Antioxidant, Oxidant and Paraoksonaz Levels in human milk.

Dr. Murat MİNİCİ, Master Thesis, KONYA, 2013

Purpose: To determine the levels of Total Antioxidant Activity (TAS), Total Oxidant Activity (TOS) and Paraoksonaz-1 (PON-1) in the fresh and frozen human milk and in the To evaluate the effects of adding vitamin D into human milk and storage temperatures of human milk on the levels of TAS, TOS and PON-1.

Method: Ten ml of expressed human milk was taken from the mothers included to study on the 5th to 15th days (transitional milk) after birth on the same day at the same hour. TAS, TOS and PON-1 levels were measured. The human milk without adding vitamin D and adding 800Ü vitamin D (6 drops Devit-3) was kept at -20° and -80°Celsius for 72 hours. At the end of the 72 hours period, TAS, TOS and PON-1 levels were measured.

Findings : The TAS level of the fresh human milk added vitamin D, was decreased to be statistically significant ($p=0.001$). TAS level of the milk without adding vitamin D and kept at -80°Celsius fell less than the one kept at -20° Celsius. The TOS levels in the human milk kept without adding vitamin D fell quite significantly ($p=0.001$) compared to the milk added vitamin D and kept at -80°Celsius.

The TOS level of the milk added vitamin D and kept at -80°Celsius increased significantly ($p=0.002$). When the human milk kept at -20° and -80°Celsius without adding vitamin D compared, the TOS value in latter was found significantly low (0.028).

When compared to the fresh human milk, PON-1 value in the human milk added vitamin D fell significantly ($p=0.021$). PON-1 value in the human milk kept without adding vitamin D and kept at -80°C fell vis-à-vis the one kept at -20°C ($p=0.021$).

Conclusion: The antioxidant activity is at the highest level in the fresh human milk. Adding vitamin D into the human milk did not increase the antioxidant activity in human milk. It was concluded that keeping the human milk at -80°Celsius without adding vitamin D is more convenient than the keeping it at -20°C.

This thesis was supported by Management Unit of Scientific Research Projects (project number: 131518007).

İÇİNDEKİLER:

ÖNSÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	ix
1-GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2-GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Dünyada ve Türkiye’de anne sütü ile beslenme.....	3
2.2.Anne sütü ve içeriği	4
2.2.1 Kolostrum.....	4
2.2.2 Geçiş Sütü.	5
2.2.3. Olgun Süt.....	5
2.3. D vitamini	6
2.3.1. D vitamini kaynakları	7
2.4. Serbest radikaller ve oksidatif stres	10
2.4.1. Serbest radikaller.....	10
2.4.2. Serbest radikallerin hedef organları.....	11
2.4.3. Serbest oksijen radikallerinin ölçümü.....	11
2.5. Antioksidan sistemler.....	11
2.5.1. Enzimatik antioksidanlar.....	12
2.5.2. Nonenzimatik antioksidanlar.....	13
2.6. Total antioksidan kapasite (TAK).....	14
2.7. Paraoksonaz–1 (PON–1) enzimi.	14
2.7.1. Paraoksonaz–1(PON1) enziminin yapısı.....	15
2.7.2 Paraoksonaz enziminin fonksiyonu	16
3- GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	19
4- BULGULAR.....	21
5- TARTIŞMA.....	28
6- SONUÇLAR.....	32
7-KAYNAKLAR.....	33

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1: İnsan PON1 enziminin substratları

Tablo 2: Çalışma grubundaki annelerin(n=35) yaşları ve doğum haftaları, bebeklerin kilo ve doğum haftaları

Tablo 3: D vitamini eklenen ve eklenmeyen anne sütündeki TAS düzeyi karşılaştırılması

Tablo 4: Karşılaştırılan TAS düzeylerinin p değerleri

Tablo 5: D vitamini katılan ve katılmayan anne sütündeki TOS düzeyi karşılaştırılması

Tablo 6: Gruplar arası TOS düzeylerinin karşılaştırılması p değerleri

Tablo 7: : D vitamini katılan ve katılmayan anne sütündeki PON-1 düzeyi karşılaştırılması

Tablo 8: Karşılaştırılan PON-1 düzeylerinin p değerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: PON-1 enziminin yapısı

2. KISALTMALAR

ABTS: 2,2-azino-bis (3-etilbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)

CAT: Katalaz

DHA : Dokozahekzaenoik asit

DNA: Deoksiribonükleik asit

GPx: Glutasyon peroksidaz

GR: Glutasyon redüktaz

GST: Glutasyon S transferaz

HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein

Hgb: Hemoglobin

HO-: Hidroksil radikali

H₂O₂: Hidrojen peroksit

IgAs: Sekretuar immünglobulin A

LDL: Düşük dansiteli lipoprotein

LOO[•]: Lipid peroksit radikali

LOOH: Lipidhidroperoksit

LPO: Lipit peroksit

MDA: Malondialdehit

NEC: Nekrotizan enterokolit

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

O₂^{-•}: Süperoksit radikali

O₂↓↑: Singlet (tekil) oksijen

PAF-AH: Trombosit Aktive Edici Faktör Asetil Hidrolaz Plateleti

PNL: Polimorf nükleuslu lökositler

PON-1: Paroksonaz

PVL: Periventriküler lökomalazi

RDS: Respiratuar distres sendromu

ROP: Prematüre retinopatisi

SD: Standart Deviation (Standart sapma)

SOD: Süperoksit dismutaz

SOR: Serbest oksijen radikalleri

SPSS: Statistical Package For Social Sciences

TAS: Total antioksidan durum

TBARS: Thibarbitric acid reactive substance

TOS: Total oksidan durum

UDP-galaktoz : Üridin difosfat galaktoz

YDYBÜ: Yenidoğan yoğun bakım ünitesi

8-OhdG: 8-hydroxydeoxyguanosine

1. GİRİŞ

Anne sütü içerdiği bileşikler ve besin öğeleri ile sağlıklı büyüme ve gelişmeyi sağlayabilen iyi dengelenmiş, biyoyararlılığı yüksek, yenidoğan için sindirimi kolay ideal bir besin kaynağıdır. Günümüzde bebeklerin doğumdan başlayarak ilk 6 ay boyunca yalnız anne sütü ile beslenmesi, bu süre içinde su dahil hiçbir ek besin verilmemesi, 6 aydan sonra tamamlayıcı beslenme ile birlikte emzirmenin iki yaşına kadar devamı önerilmektedir (Neyzi ve ark 2010).

Anne sütü ile beslenmenin, bebek mortalite ve morbidite oranlarını azaltması, bebeklerin uygun beslenme, büyüme ve gelişmelerini sağlaması, diğer tüm beslenme şekillerinden üstünlükleri, aileye ve ülkeye getirdiği yararlar tüm dünya tarafından bilinmektedir (Ünsal ve ark 2005).

Ülkemizde de çalışan anne nüfusunun giderek artması ile annelere tanınan doğum sonu izni, ücretsiz izin ve süt izni gibi sosyal haklarla emzirme teşvik edilmektedir. Ancak bazen bebeğin anne sütünün prematüre bebeklerde olduğu gibi bebeğin ihtiyaçlarından fazla olması veya anneden alınan sütün bebeğin tıbbi sorunları nedeniyle yoğun bakımda enteral beslenme yapılamadığı için bebeğe verilememesi durumunda saklanması gerekmektedir. Anne sütü oda sıcaklığı üstünde 3 saat (daha düşük sıcaklıklarda 4-6 saat), buzdolabı kapağında 3 gün ve derin dondurucuda 3 aya kadar saklanabilmektedir. Bu saklanma dönemlerinde canlı, biyolojik ve dinamik bir ürün olan sütteki değişim sürekli araştırma konusu olmuştur. Literatürde sütün saklanması ile ortaya çıkan bir takım özelliklerinin kaybı konusunda çelişkili sonuçlar vardır

Organizmada, sistemi etkileyen çeşitli preoksidatif faktörler ile bunları dengelemek amacıyla oluşan antioksidatif sistem arasında bir denge bulunmaktadır. Biyolojik sistemlerde, normalin üzerinde bir oksidatif stres olduğu zaman, organizma bu duruma uyum sağlayacak şekilde yanıt vermektedir (Yesilkaya ve ark 2000). Oksidatif stresin boyutlarının fazla olması veya yanıtın yetersiz kalması durumunda ise oksidatif hasar oluşmaktadır ve bu da proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllerin oksidasyona uğraması ve buna bağlı olarak da hücre membranı başta olmak üzere çeşitli hücre elemanlarında oksidatif harabiyet meydana gelmektedir (Dani ve ark 2003).

Yüzden fazla hastalık serbest oksijen radikalleri ile ilişkilendirilmektedir. Yenidoğan bebeklerde ilk günlerde oksijen radikallerine karşı anti-oksidatif kapasitesinin yeterli olmadığı gösterilmiştir (**Kılınç ve ark 2002**). Özellikle prematüre bebeklerde bu duruma daha çok rastlanmaktadır. Çünkü antioksidan enzimlerin miktarı ve aktivitesinin artışı ancak gebeliğin son aylarında gerçekleşmektedir (**Wiedemann ve ark 2003**). Doğum sonrası ilerleyen günlerde, total antioksidan kapasitenin yenidoğanlarda yükseldiği ve yetişkinlerden daha yüksek seviyelere ulaştığı bildirilmektedir (**Robles ve ark 2001**). Anne sütü antioksidan özellikleri ile de yenidoğan bebek için koruyucu özellik göstermektedir. Ancak anne sütünün bekletilmesi ve saklanması sırasında antioksidan özelliğinde değişim oluşabilir. Bu değişim total antioksidan seviye, total oksidan seviye ile gösterilebilir.

Wiesman'ın yaptığı çalışmada D vitamini demir bağımlı lipit peroksidasyonunu inhibe ederek membranda antioksidan etkisini tespit etmiştir. Yapılan başka bir çalışmada diyabetli hastaların bir grubuna D vitamini verilmiş ve D vitamini verilmeyen gruptaki hastalarda karaciğer ve kanda oksidatif stresin arttığı tespit edilmiş. D vitamini diyabetli hastalarda oksidatif stres aracılı vasküler komplikasyonlara karşı önemli bir koruma sağladığını tespit etmişler (**Salum ve ark 2013**).

Bu çalışmamızda -20° ve -80°C'te taze sağılmış anne sütünde mevcut var olan antioksidan düzeyi korumak veya arttırmak için, antioksidan bir madde olarak bilinen D vitamini anne sütüne eklenmeksizin ve eklendiğinde ortaya çıkan TAS, TOS VE PON-1 düzeylerindeki değişimi tesbit etmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Anne sütü, her bebek için özgül olması, bebeği enfeksiyonlardan koruması, bebeğin optimal büyümesi için gerekli tüm besin öğelerini içermesi ile bebek için eşsiz bir besin kaynağıdır. (Balci 2011).

2.1 Dünyada ve Türkiye’de Anne Sütü ile Beslenme:

Dünyada, Türkiye'nin de içinde bulunduğu pek çok ülke tarafından imzalanan ve uygulamaya konulan Çocuk Hakları Sözleşmesi'nde, "anne sütü ile beslenme hakkı" üzerinde önemle durulmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü de, anne sütünün ve emzirmenin vazgeçilmez değeri hakkında eğitim verme ve anne sütü alma süresini uzatma çabası içindedir. Bebeklerin doğumdan başlayarak ilk 6 ay boyunca yalnız anne sütü ile beslenmesi ve bu süre içinde su dahil hiçbir ek besin verilmemesi önerilmektedir.

Ülkemizde kanunlar çerçevesinde; Anne sütünün özendirilmesine ve annelere emzirme konusunda bilgi ve doğru alışkanlıkları kazandırılmasına yönelik Sağlık Bakanlığı'nın çalışmaları kapsamında doğum hizmeti veren hastanelerde emzirmenin başarılı ve yerleşik uygulama haline gelmesini sağlamak üzere 1991 yılında Anne Sütünün Teşviki ve Bebek Dostu Hastaneler Programı başlatılmıştır. 6331 sayılı kanun (4857 sayılı İş Kanunu'nun 74. Maddesi) gereği, gebe ve emziren çalışan annelere günde 7,5 saatten fazla çalıştırılmaması ve yaşları ve medeni halleri ne olursa olsun, 100-150 kadın çalışanı olan işyerlerinde, emziren çalışanların çocuklarını emzirmeleri için işverenlerce çalışma yerlerinden ayrı ve işyerine en çok 250 metre uzaklıkta emzirme odası kurulması kanunlaştırılmıştır.

Kadın memurların doğumdan sonraki analık izni süresi sekiz haftadan yirmidört haftaya çıkartılarak, kadın memurların toplam analık izin süresi onaltı haftadan otuziki haftaya çıkartılmıştır.

Memurlara, bir yaşından küçük çocuklarını emzirmeleri için günde toplam bir buçuk saat süt izni verilir. Süt izninin kullanımında annenin saat seçimi hakkı vardır.” şeklinde ve 108 inci maddesinin üçüncü paragrafı “Doğum yapan memurlara istekleri halinde 104 üncü maddenin (A) bendinde belirtilen sürelerin bitiminden itibaren 12 aya

kadar aylıksız izin verilir.” şeklinde değiştirilmiştir. Tüm bu çalışmalar çalışan anne bebeklerinin anne sütünden mahrum kalmasını engellemek içindir.

2.2. ANNE SÜTÜ VE İÇERİĞİ

Anne sütünün içeriği incelenen süt örneğinin alındığı zamana göre değişiklik gösterir. Kolostrum, geçiş sütü ve olgun sütün içeriği birbirinden farklıdır. Süt örneğinin emzirmenin başında ya da sonunda alınması durumunda da içerik değişmektedir (**Gür 2007**). Prematüre bir bebeği olan annenin sütü ile, term bir bebeği olan annenin sütünün içeriği de farklıdır. Kısacası her anne kendi bebeğinin fizyolojik ihtiyaçlarına uygun olarak süt üretmektedir. Örneğin prematüre bebeklerin annelerinin sütlerinde uzun zincirli, çoklu doymamış yağ asitleri daha yüksek düzeyde bulunur. Yine benzer şekilde emzirmenin başlangıcında düşük olan yağ oranı emzirmenin sonuna doğru artış göstermektedir (**Balcı 2011**). Anne sütündeki antienfektif özelliklerde annenin karşılaşmış olduğu patojen organizmalara ve emzirme dönemine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (**Morrow ve ark 2004**).

Son sütteki yağ içeriğinin fazla olması bebekte doyunluk hissine neden olarak bebeğin memeyi bırakmasını sağlar ve obeziteye karşı bebeği korur. Anne sütünün özellikleri doğumdan sonra kolostrumdan olgun süt üretilmesi şeklinde değişkenlik gösterir: Kolostrum (0-5 gün), geçiş sütü (5-15 gün), olgun süt (15-30 gün) (**Balcı 2011**).

2.2.1. Kolostrum

Doğumdan sonra ilk 5-7 günde salgılanan koyu sarı renkli süttür. Protein, mineral ve vitaminlerden zengindir. Sarımsı renk yüksek beta karoten düzeyinden kaynaklanmaktadır. Antienfektif unsurlar, A, D ve B12 vitaminleri, sodyum ve çinko düzeyi olgun süte göre daha fazladır. Kolostrumun özgül ağırlığı 1040-1060 arasında değişir. Bir öğünde üretilen miktar 2-20 ml arasında değişmektedir. Enerji içeriği 67 kcal/dl'dir. Doğar doğmaz ilk anne sütü alan bebeklerin ağızdan itibaren tüm gastrointestinal sistemi özellikle sekretuar Immünglobulin A (IgA) ile kaplanarak patojen mikroorganizmalara karşı bir bariyer oluşturulur. Olgun süte göre daha fazla protein içerir, Arjinin ve Triptofandan zengindir (**Köksal ve ark 2003**). Buna karşılık yağ ve laktoz içeriği olgun süte oranla daha azdır. Antikor yüklü olması nedeni ile bebeğin ilk aşısı sayılmaktadır. İçerdiği kazeinin sindirimi kolaydır ve mideyi çabuk terk eder. Yenidoğan için gerekli bir aminoasit olan taurin kolostrumda 3-7. günler arasında 400 nmol/ml düzeyine erişir. Laktaz yapımı yeni başladığından düşük laktozlu olan besini bebek daha

kolaylıkla sindirir. İlk günlerde salgılanan kolostrumda 2.2 gr/dl protein varken, 15 gün sonra salgılanan olgun sütte 1.1 gr/dl protein bulunmaktadır. Bunun nedeni ise ilk günlerde bebeğin mikroplara karşı ciddi bir korunmaya ihtiyaç duymasıdır. Kolostrum, doğumdan sonra 7-15. günlerde yerini geçiş sütüne bırakır. Doğumdan sonraki 7-15 günler arasında üretilen süt “geçiş sütü” olarak bilinir. Bu sütte toplam protein miktarı azalırken laktoz, yağ ve kalori içeriği artmaktadır. İlk 2 haftadan sonra anne sütü “olgun süt” özelliği kazanır (**Köksal ve ark 2003**).

2.2.2. Geçiş Sütü

Kolostrumdan sonra salgılanmaya başlar ve yaklaşık 2 hafta devam eder. Geçiş sütündeki elementlerin düzeyi genellikle kolostrum ile matür süt bileşimi arasındaki değerlerdir. Geçiş sütünde fosfor düzeyi kolostrum ve matür sütte olduğundan daha yüksektir. Kolostruma göre total protein oranı azalmaya başlar. Daha yüksek oranda yağ, laktoz, vitamin içerir ve kalori değeri artmaya başlar. Anne sütü %3,5-4,5 oranında yağ içerir ve enerjinin %40-50’sini sağlar. Yağ içeriğinin %98’ini trigliseridler oluşturur. Yağ sentezi alveolar hücrelerde gerçekleşir ve memenin sağılması ve prolaktin sekresyonu ile stimüle olur. Araflidonik asit (AA) ve docasahexaenoik asit (DHA) iki önemli yağ asididir ve beyin, retina gelişimini destekler. AA ve DHA preterm bebeklerin anne sütünde daha fazla bulunur (**Köksal ve ark 2003**).

2.2.3. Olgun Süt

Anne sütünün bileşimi laktasyon dönemine, incelenen örneklerin emzirmenin başında ya da sonunda alınmış olmasına, gün içinde alındığı zaman dilimine, bebeğin doğduğu gebelik haftasına ve yaşına göre değişkenlik gösterir (**Neyzi ve ark 2010**). Bebek beslenmesi süresince iki tip süt salgılanır. Emzirmenin başlangıcında gelen süt (fore milk-ön süt) yağdan fakir, laktozdan zengin sulu süttür. Bu sütün özelliği, özellikle çocuktaki dehidratasyonu ve hipoglisemiyi önlemesidir (**Gür 2007**). Beslenme uzadıkça çocuk yağlı sütte ulaşır ve sütün yağ içeriği 3 kat, proteini ise 1.3 kat artış gösterir. Emzirmenin sonuna doğru salgılanan ve yağdan zengin olan süt (hind milk-son süt) çocukta doygunluk hissine neden olarak memeyi bırakmasını sağlar. Annesütünün %87’sini su oluşturmaktadır. Bu nedenle ilk 6 ay bebeğin anne sütü dışında su veya su bazlı sıvılara ihtiyacı yoktur (**Köksal ve ark 2003**).

2.2 Anne Sütü Saklanması:

Depolanma ve dondurma sonucu, anne sütünün hangi bileşenlerinin etkilendiği bilinmemektedir. Anne sütünün saklanması; nasıl sağıldığı, saklama kabı veya torbası, saklama ısı, saklama öncesi sterilizasyon veya pastörizasyon, tekrar eritme işlemi depolanan sütü etkilemektedir. İdeal toplama, emme işlemindeki gibi ritmik negatif basınç sağlayan elektrikli pompalarla olmaktadır. Saklama kabı, polipropilen veya polietilen olmalıdır. Diğer maddelere sütteki hücreler yapışmaktadır (**Goldblum ve ark 1981**). Anne sütünün sağıldıktan sonra; soğutulması ile vitaminlerin, hücresel içeriğin, protein ve lipitlerin kaybı azaltılabilmektedir. Anne sütü; oda sıcaklığında (25 °C) 8 saat süreyle besleyici ve koruyucu özelliklerini korumakta, 0-4 °C'de 48-72 saat dayanıklı kalmakta (**Lawrence 1999**). Uzun depolamanın ve -20 °C de dondurmanın etkileri tam olarak bilinmemektedir. Anne sütünün sağıldıktan sonra, 24 saate kadar buzlu bir soğuk kaptaki bekletilmesi; aşırı mikrobik çoğalmaya ve protein yıkımına neden olmamaktadır. Fakat bu durumda dahi lipoliz gerçekleşir ve lipoliz sonucu oluşan bileşiklerin bakteriyel çoğalmayı yavaşlattığı düşünülmektedir (**Hamosh ve ark 1996**). Anne sütünü bir hafta süreyle -20 °C de dondurup, ardından eritmenin; toplam enerji, laktoz, yağ ve protein içeriğine etkisinin olmadığı gösterilmiştir (**Ezz El Din ve ark 2004**).

Anne sütünü; +4 °C'de 48 saat saklama ile hücre canlılığı belirgin azalırken, süt proteinleri denatüre olmaz. Canlı süt hücrelerinin antibakteriyel etkisi, 24-48 saat süreyle korunur. Ancak; -20 °C'de 1 ay saklama sonucu, hücre canlılığı %89 azalır. IgA, IgM, IgG, laktoferrin, lizozim, komplemanlar, amino asitler ve yağ asitleri ise büyük oranda korunur (**Evans ve ark 1978**). Hızlı donma ve erime işlemi, süt-yağ globül membranlarının ayrılmasına ve donmuş sütün bakteriyostatik kapasitesinin azalmasına yol açabilir. Bu nedenle; 3 güne kadar saklamalarda anne sütünün soğutulması, 1 aya kadar depolanmalarda ise dondurulması önerilmektedir. Anne sütünün; +4 °C'de 24 saatten fazla, oda sıcaklığında (15-27) °C 8 saatten fazla, 30 °C ve üstünde ise 4 saatten fazla bekletmelerde, bakteriyel çoğalma gözlenmiştir (**Igumbor ve ark 2000**).

2.3. D VİTAMİNİ

Anne sütü D vitamininin 5 metabolitini içerir, 40-50 IU/l D vitamini aktivitesi sağlar. Ancak ek D vitamini gereksinimi vardır (**Balcı 2011**).

D vitamini, hormon benzeri fonksiyonları olan bir grup steroldür. Yağda eriyen vitaminler arasında bulunmaktadır. D vitamininin en önemli etkisi kalsiyum homeostazı ve kemik sağlığı üzerinedir. Kişide vitamin D düzeyinin normal, eksik veya fazla olduğunu anlamak için 25(OH)D düzeyine bakılmalıdır. Çünkü 25(OH)D yarı ömrü 2-3 hafta olan major sirkulatuar formdur. Hem Vitamin D alımını ve hem de endojen yapımını göstermektedir. 25(OH)D düzeyi; 20 ng/ml den düşük ise D vitamini eksikliği, 21 ile 29 ng/ml arasında ise D vitamini yetersizliği, 30 ng/ml den yüksek ise normal D vitamini düzeyi, 150 ng/ml den yüksek ise D vitamini intoksikasyonu olarak belirlenmiştir. 25(OH)D 150 ng/ml üstünde olduğunda vitamin D intoksikasyonu görülmektedir. Ancak çok nadirdir. İnfantlarda D vitamininin günde 40.000IU 1-4 ay kullanımı, erişkinde ise günde 100.000 IU birkaç ay kullanımı sonrasında vitamin D intoksikasyonu görülebilmektedir.

Steroid bir prohormon olan D vitamini, kalsiyum ve fosfor metabolizmasına olan etkileri yanında immün sisteme de katkıda bulunmaktadır (İkizoğlu ve ark 2005). 1,25 dihidroksivitaminD3'ün immün sistem modülatörü olduğu ve TLR koreseptörü CD14'ün ekspresyonunu uyardığı bulunmuştur. Bu hormon keratinosit, monosit ve nötrofillerde antimikrobiyal peptid sekresyonu ve aktivitesini arttırmaktadır (Engedal ve ark 2004). İnfeksiyonlara immün yanıtı arttırmanın dışında D vitamininin otoimmün hastalıkları engellemedeki rolü de bilinmektedir. D3 vitamini Th hücrelerinin proliferasyonunu azaltırken, IFN- γ , IL-2 ve IL-5'in yapımını azaltmakta; Th2 hücrelerince IL-4 yapımını arttırmaktadır. CD4+ T-hücreleri üzerindeki D vitamini reseptörlerinin aktivasyon ile arttığı saptanmıştır, bu nedenle de D vitamini etkisinin hücrenin aktivasyon ve diferansiasyon durumuna göre değiştiği düşünülmüştür (Mahon ve ark 2003). Raşitik çocuklarda solunum sistemi hastalıklarının sıklığının artışında D vitamininin immünmodülatuar etkisinin rol oynadığı düşünülebilir (Balcı 2011)

2.3.1. D Vitamini Fonksiyonu

1,25(OH)₂ genel fonksiyonu plazma kalsiyum düzeyini sürdürmektir.

1. 1,25(OH)₂D Duodenumdan Ca absorpsiyonu arttırmaktadır.

Vitamin D reseptör -retinoik asid x- reseptör complex (VDR-RXR) ile etkileşerek epitelyal kalsiyum kanal, calbindin 9K, kalsiyum bağ layıcı protein (CaBP) ekspresyonunu arttırmaktadır.

2. 1,25(OH)2D, ileumdan P absorpsiyonu arttırmaktadır. D vitamini olmadığında diyetten kalsiyumun %10-15'ı, fosforun %60'ı emilebilmektedir.

Vitamin D reseptor aktivasyonu olduğunda ise kalsiyum emilimi %30-40, fosfor emilimi ise %80 oranında artmaktadır.

3. 1,25(OH)2D, böbrekten kalsiyum kaybını azaltmaktadır.

4. 1,25(OH)2D, kemik rezorpsiyonunu arttırmaktadır.

Vitamin D reseptor aktivator of nuklear faktor kB ligand (RANKL) ekspresyonunu arttırmaktadır. RANKL Preosteoklastlarda RANK ile etkileşime girerek preosteoklastların matur osteoklastlara dönüşmesini sağlamaktadır. Böylece kemik rezorpsiyonu artmaktadır.

5. 1,25(OH)2D, paratiroid glandlardan PTH sentezini ve salınımını azaltmaktadır.

6. 1,25(OH)2D, 200'den fazla geni kontrol etmektedir. Bu genler hücre proliferasyonu, diferansiasyonu, apoptozis ve anjiogenezisi düzenlemektedir.

7. 1,25(OH)2D, iyi bir immunomodülatördür.

8. 1,25(OH)2D, insülin yapımını arttırmaktadır.

9. 1,25(OH)2D, renin sentezini azaltmaktadır.

10. 1,25(OH)2D, myokardial kontraktileti arttırmaktadır.

11. Lipit peroksidasyonunu engellemek

12. DNA'yı oksidatif hasardan korumak.

13. Glutatyonu arttırmak

Japonlar dünyada en yüksek kan vitamin D düzeyine sahip millet olmakla birlikte Japonya'da prostat kanseri sık görülmemektedir. Vitamin D ve kalsiyumun diyetle alınmadaki düzeltmelerin kanser riskini azalttığı gösterilmiştir (**Lappe ve ark 2007**).

Hodgkin lenfoması, kolon, pankreas, prostat, over, meme kanserlerinde antioksidan etkisinden yararlanılmaktadır (**Sözen 2011**).

Robien ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada 321 postmenopozal kadına günlük 800Ü D vitamini veriliyor ve yaklaşık 5 yıl boyunca düzenli kullananlarda meme kanseri görülmesi belirgin azaldığını gözlemlemişler (**Robien ve ark 2007**).

Yapılan başka bir çalışmada İspanyol olan ve olmayan meme kanserlerine D vitamini verilmiş. Oksidatif DNA hasarını önleyerek meme kanseri oranı azaldığı tespit

edilmiş. Ancak eşit oran da azalma olmayınca genetik polimorfizm olabileceği ileri çalışma gerekli olduğu vurgulanmış (**Rollison ve ark 2012**).

Başka çalışmada 100 sağlıklı ve 100 tane de TİP 2 DM hasta alınıp total antioksidan kapasite (TAK), süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon redüktaz (GR) ve glutasyon peroksidaz (GSH-PX) ölçüldü. D vitamini eksikliği, İran yetişkin nüfus arasında ve tip 2 diyabeti olmayanlarda yüksek oranda bulunmuş, ancak diyabetli hastalarda D vitamini eksikliği daha fazla görülmüş (Tip 2 diyabetli hastaların %82 ve sağlıklı deneklerin 75% D vitamini eksikliği veya yetersizliği). Sonuç olarak D vitamini, TİP 2 DM hastalarda glisemik profilleri ve oksidatif stres kontrolü üzerinde olumlu etkisi olabileceği sonucuna varılmış (**Saedisomeolia ve ark 2013**).

Başka bir çalışmada D vitamininin antioksidan, antiinflamatuvar ve otoimmün özellikleri olduğu gösterilmiştir. In vitro, in vivo ve hayvan deneylerinde vitamin D'nin rolü beyinde farklılaşma, neurotrophism, nöroproteksiyon, nörotransmisyon ve nöroplastisite uyardığı ve glutasyonu arttırdığını, DNA tamirinde görev alan genleri arttırdığını ve nöbet eşiğini yükselttiğini göstermişler. D vitamini, belkide farmakolojik, yeterli doz otizm çekirdek belirtileri bir tedavi etkisi olabilir (**Cannell 2013**).

Başka bir çalışmada, sıçanlarda bir grupta streptozosin ile diyabet oluşturulmuş ve diğer bir grupta D vitamini 500Ü. 10 hafta kolekalsiferol verilmiş. Streptozotosin ile diyabet oluşturulan grupta serum ve karaciğerde oksidatif stres artmıştır. Vitamin D verilen grupta Diyabet oksidatif stres aracılı vasküler komplikasyonlara karşı önemli bir koruma sağladığı görülmüş (**Salum ve ark 2013**).

Fedirko ve arkadaşlarının yaptığı başka bir hayvan çalışmasında kolorektal adenom olan hastalar (N = 92) 6 ay içinde 2 g / gün kalsiyum ve / veya 800 IU / gün D vitamini ve plasebo ile tedavi edildi. Normal görünümlü rektal mukoza biopsilerinde 8-OH-dG bir kolorektal crypt dağılımı standart otomatik bakılmış ve D vitamininin oksidatif DNA hasarını önlediğini ve D vitamini alan grupta kanser ilerlemesinin azaldığı, normal kolorektal floranın arttığı tespit edilmiş (**Fedirko ve ark 2010**).

Başka bir çalışmada kolorektal karsinomlu hastalara 800Ü. D vitamini verilip aylık biopsi ile takip edilmiş ve D vitamin alan grupta normal insan kolorektal mukoza oksidatif

DNA hasarın kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiş. Normal kolorektal epitel CYP27B1 ve CYP24A1 reseptör varyasyon gösterebileceği söylenmiştir (**Ahearn ve ark 2011**).

D vitamininin, kalsiyum dengesi ve kemik metabolizmasının düzenlenmesinde geleneksel rolüne ek olarak; bağışıklık, antiproliferatif ve kanser önleyici etkileride mevcuttur. Moleküler mekanizma olarak D vitamininin kanser önleyici özellikleri tam olarak anlaşılamamıştır. D vitamin, lenfositler tarafından endojen oksidanlar düzeyini %50-70 düşürür ve A549 ve TK6 hücrelerde tarafından sinyal DNA hasarı zayıflama 2,7-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) okside yeteneği 1,25-VD DCFH oksidasyon yeteneğinde azalma görmüşler. Bu bulgular ise antioksidan 1,25-VD aktivitesini oluşturmaktadır. Bu etkiler sonucu: DNA tamir mekanizması, kanser önleyici özelliklerini açıklar (**Halicka ve ark 2012**).

Wiseman'ın yaptığı bir çalışmada Kolkalsiferol (D3 vitamini) ve kendi aktif metabolit 1,25-dihidroksikolekalsiferol ve ergokalsiferol (Vitamin) D2' nin membran antioksidan etkisi gösterilmiştir. Bu etkiyi lipit peroksidasyon üzerinden, membran akışkanlığına etki ederek göstermişler. Kolekalsiferol aktif metaboliti kadar, antioksidan etkili olmasada antioksidan etkisi gösterilmiştir. D vitamininin Kolon kanseri ve meme kanserinde antioksidan etkisi ile koruyuculuğu gösterilmiştir. D vitamini deride oluşum mekanizması içinde olduğundan deri kanserinde de antioksidan etkisinden yararlanılabilir (**Wiseman 1993**).

2.4 SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES

2.4.1 Serbest radikaller

Serbest oksijen radikalleri (SOR), metabolik ve fizyolojik süreçler sırasında meydana gelen ve enzimatik olan veya olmayan antioksidan mekanizmalar ile uzaklaştırılan maddelerdir. Bütün organizmalarda SOR üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasında hassas bir denge vardır. Oksidatif stres, serbest oksijen radikallerinin üretimi ile bunların antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılması arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. Yenidoğan dönemi kendine has özelliklerinden dolayı oksidatif stres açısından riskli bir dönemdir. Yenidoğan bebekler, doğum sonrasında özellikle ilk hafta yüksek düzeyde oksidatif strese maruz kalmaktadır. İntrauterin dönemdeki düşük oksijenli ortamdan doğum sonrası aniden yüksek oksijenli ortama geçiş fazla miktarda serbest

oksijen radikali oluşumuna neden olmaktadır. Serbest oksijen radikalleri lipid, protein, polisakkarit oksidasyonuna ve DNA hasarına neden olarak; Diyabetes mellitus, nekrotizan enterokolit (NEK), patent duktus arteriyozus (PDA), hipoksik iskemik ensefalopati (HİE), prematüre retinopatisi (ROP), bronkopulmoner displazi (BPD), periventriküler lokomalazi (PVL), intraventriküler hemoraji (İVH) gibi patolojiler başta olmak üzere 100'den fazla hastalığın gelişmesinden sorumlu tutulmaktadır (Gitto ve ark 2009, Naito ve ark 2010).

2.4.2 Serbest Radikallerin Hedef Organları

Yüzden fazla hastalık serbest oksijen radikalleri ile ilişkilendirilmektedir. Serbest radikaller, intraventriküler hemoraji (İVH), periventriküler lökomalazi (PVL), travmatik beyin hasarı, beyin tümörleri etyopatogenezinde rol oynar. Gözlerde katarakt, retinopati, makuler dejenerasyon oluşumuna neden olabilmektedir. Solunum sisteminde; astım, amfizem, respiratuar distres sendromu (RDS), kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH), böbreklerde; glomerulonefrit ve renal yetmezlik oluşumunda rol almaktadır. Nekrotizan enterokolit (NEK), Crohn hastalığı, hemoglobin ve immun sistem hastalıkları oluşumunda rol almaktadır. Serbest oksijen radikalleri erken yaşlanma, kanser, otoimmün hastalıklar ve enflamatuvar hastalıkların etyopatogenezinde de rol almaktadır (Bayır 2002, Cirak ve ark 2003).

2.4.3 Serbest Oksijen Radikallerinin Ölçümü

Kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikallerin ömrü oldukça kısadır. Bundan dolayı laboratuvar şartlarında ölçülmesi zordur. Genellikle *spin rezonans* ve *spin trapping* metotlarıyla ölçülürler. Ancak bu metotlarla ölçüm teknik olarak oldukça güçtür. Serbest radikallere bağlı oluşan ürünlerin ölçümü daha pratik metotlardır. Serbest radikallerin en önemli etkileri lipid peroksidasyonudur. Yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu aldehitler oluşur (MDA gibi). Günümüzde serbest radikal ölçümünde en çok kabul gören yöntem TBARS (thibarbitric acid reactive substance), MDA veya ABTS (2,2-azino-bis-3 etilbenzthiazoline- 6-sulfonic acid) belirteçlerini kullanarak ölçüm yapmaktır (Erel 2005, Traverse ve ark 2006).

2.5. ANTiOKSiDAN SiSTEMLER

Vücutta oluşan serbest oksijen radikallerini metabolize eden, serbest oksijen radikali oluşumunu önleyen, temizlenmesini arttıran, oluşabilecek hasarı onaran veya önleyen savunma maddeleri vardır. Savunma yapan bu maddelere antioksidan madde denir. Aerobik hücrelerde bulunan antioksidan maddeler ekzojen veya endojen kaynaklı olabilmektedir (**Akkuş 1995**).

Endojen antioksidanlar; enzimatik (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, glutatyon transferaz, mitokondriyal oksidaz sistemi) veya non-enzimatik (bilirubin, albumin, urik asit, α -tokoferol, seruloplazmin, transferin, ferritin, glutatyon) maddelerdir. Bunlar oksijen radikallerine karşı ilk savunma sistemini oluşturmaktadır (**Buhimschi ve ark 2003, Hung 2007**).

Ekzojen antioksidanlar; C vitamini, E vitamini, folik asit, N-asetilsistein, mannitol, adenozin, demir şelatörleri, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflatuar ilaçlar sayılabilir (**Akkuş 1995, Hung 2007**).

Antioksidanlar işlevlerine göre primer, sekonder ve tersiyer olarak üçe ayrılır. Primer antioksidanlar (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, ferritin, seruloplazmin, haptoglobulin, metal bağlayıcı proteinler, hemopeksin), yeni serbest radikal oluşumunu önler. Sekonder antioksidanlar (vitamin-C, vitamin-E, urik asit, bilirubin), zincir kırıcı reaksiyonlar sayesinde serbest radikalleri uzaklaştırırlar. Tersiyer antioksidanlar (DNA onarımı yapan enzimler) ise serbest radikaller tarafından hasar gören biyomolekülleri onarırlar (**Akkuş 1995**).

2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.5.1.a. Süperoksit dismutaz (SOD): SOD substrat olarak oksijen radikalini kullanarak superoksiti hidrojen peroksite çeviren bir metalloenzimdir. Lipit peroksidasyonunu inhibe etmektedir.SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. Hücre dışı aktivitesi düşüktür. SOD, lösemi, RDS, iskemik olaylar, hepatit, preeklampsi ve sepsis gibi olaylarda koruyucu rol oynamaktadır (**Scandalios2002**).

2.5.1.b. Katalaz: Katalaz hidrojen peroksiti su ve oksijene ayırılmaktadır. Peroksizomlarda bulunur. Bulunduğu hücreyi oksidatif strese karşı korumaktadır (**Raha ve ark 2000**).

2.5.1.c. Glutasyon peroksidaz (GPx): Hücre sitozolünde bulunan bir enzimdir. SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksit ve yağ asiti peroksitlerini inhibe ederler. Kofaktor olarak selenyum kullanır. Fagositik hücrelerin ve eritrositlerin oksidatif strese karşı korumaktadır.

2.5.1.d. Glutasyon-S-transferaz (GST): Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda görev alırlar. Araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri başta olmak üzere lipit hidroperoksitlere karşı GST'ler selenyum bağımsız aktivite göstermektedir (Akkuş 1995).

2.5.1.e. Glutasyon redüktaz (GR): Glutasyon peroksidaz tarafından hidrojen peroksit ve diğer lipit peroksitlerin yükseltgenmesi sırasında glutasyon, okside glutatyona dönüşmektedir. Oksidasyona uğramış bu yapıyı tekrar kullanmak için redükte glutatyona dönüştüren enzim glutasyon redüktazdır (Akkuş 1995).

2.5.1.f. Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Superoksit radikalini suya çevirerek etki gösterir.

2.5.2. Non-enzimatik Antioksidanlar

2.5.2.a. Vitamin E: Yağda çözünen ve zincir kırıcı bir antioksidandır. En önemli görevi oksijen serbest radikallerinin ataklarına karşı membran lipitlerindeki yağ asitlerini korumaktır.

2.5.2.b. Vitamin C: Lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipitleri oksidasyona karşı korur. Antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. Fagositozda oksidatif parçalanma ürünlerinin zararlı etkilerini önler. E vitamini ile birlikte LDL oksidasyonunu engeller.

2.5.2.c. Vitamin A: Serbest radikalleri biyolojik hedeflerle etkileşime girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak da etki ederek peroksit radikallerinin oluşumunu önler.

2.5.2.d. Bilirubin: Lipit peroksidasyonunda zincirleme gelişen reaksiyonu engelleyici antioksidan olarak en az α -tokoferol kadar etkilidir. Bilirubin yüksek serum düzeylerinde toksik bir bileşiktir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda konjuge çift bağ içeren bilirubinin *invivo* ve *in-vitro* güçlü bir antioksidan olduğu ispatlanmıştır. Oksidatif stresle tetiklenen bilirubinin hızlı ve uzun süreli oksidanlara bağlı hücre yıkımında fizyolojik koruyucu olarak rol oynamaktadır (Gathwala ve ark 2000).

2.5.2.e. Ürik Asit: Kuvvetli olarak demir ve bakır bağlama yeteneği, antioksidatif rolünün önemli bir parçasıdır. Lipit peroksidasyonunu inhibe etme ve radikalleri temizleme görevine sahiptir.

2.5.2.f. Albumin: Albumin kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar. Albumin yüzeyinde oluşacak olan OH- radikali albumin tarafından temizlenir.

2.5.2.g. Seruloplazmin: Demir ve bakır bağımlı lipit peroksidasyonu inhibe eder. Daha az önemli olmakla birlikte superoksit radikali ile reaksiyona da girer.

2.5.2.h. Transferrin ve Laktoferrin: Demiri bağlayarak lipit peroksidasyonu ve demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarına katılımını durdurur veya yavaşlatır.

2.5.2.j. Polifenoller: Fenoller, aromatik halkaya bağlı OH grubu içeren etkili antioksidanlardır.

2.5.2.k. Vitamin D: Lipid peroksidasyonunu önleyerek, oksidatif DNA hasarını azaltarak ve glutatyon seviyesini arttırarak antioksidan etki gösterir.

2.6. Total Antioksidan Kapasite

Organizmaların, metabolik ve fizyolojik reaksiyonlar sonucu oluşan serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu oluşan oksidatif stres ile mücadele eden antioksidan sisteme sahiptir. Albumin, ürik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan kapasitenin %85'ini oluşturmaktadır. Yenidoğan döneminde total antioksidan kapasitenin ana elemanları bilirubin ve ürik asittir.

Total antioksidan kapasitenin ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgi vermektedir. Antioksidanların tek tek ölçülmesi, zaman alıcı, pahalı, zaman alıcı ve karmaşık teknikler gerektirmektedir. Bu nedenle total anti oksidan kapasite (total antioxidant capacity = TAC) veya total antioksidan durum (total antioxidant status = TAS) ölçümü giderek daha çok kabul görmektedir (**Wijnberger ve ark 2003, Vlachos ve ark 2006**). Yenidoğanlarda plazma TAS, hastalıktan ve uygulanan tedavilerden etkilenmektedir. Örneğin hemoliz ile plazma bilirubin düzeyinin yükselmesi veya fototerapi ile azalması, anuri ile ürik asit seviyesinin artması veya diüretiklerle seviyesinin düşmesi gibi nedenlerle TAS'ta değişiklikler meydana gelebilmektedir (**Korkmaz ve ark 2001**).

2.7.Paraoksonaz-1 (PON1) enzimi

Paraoksonaz-1 (PON1), 354 aminoasitten oluşan, paraoksonaz, arilesteraz ve diazoksonaz aktivitesine sahip bir enzimdir.PON1'i kodlayan gen 7.kromozomun q21-22

bölgesine yerleşmiştir. İnsan serum PON1 enzimi HDL ilişkili, antioksidan fonksiyona sahip olan bir enzimdir. Yapılan çalışmalarda PON1 enziminin HDL kolesterolün apo-A1 ve Apo-J(Clustrein) proteini ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (**Ekmekçi 2004**). Paraoksonaz, PON2 ve PON3'te bulunmadığından paraoksonu hidrolize edemez ve plazmada bulunmazlar. PON1'in, oromatik karboksilik asit esterleri ve paraokson, diazokson, sârin, soman gibi organofosfat türevlerini detoksifiye ettiği düşünülmektedir. Ayrıca PON1'in, LDL kolesterolü bakır (Cu) iyonu ve serbest radikallerin indüklediği oksidasyondan koruyarak antioksidan fonksiyonunu yerine getirmektedir. En belirgin etkisini, ileri düzeyde değişikliğe uğramış LDL' deki kolesterol linoleat hidroperoksitleri hidroliz ederek gösterir. Atheroskleroz gelişiminde, oksidatif stres altında oluşan hidrojen peroksit (H₂O₂)'i %25 oranında hidroliz eder. Bu özellik PON1'in peroksidaz aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. Paraoksonaz enzim aktivitesinin; miyokard infarktüsü, ailesel hiperkolesterolemi, diyabet ve kronik renal bozukluklarda azaldığı pek çok çalışma ile gösterilmiştir (**Heijmans ve ark 2000, Ekmekçi ve ark 2004, Demirdöğen 2010**).

2.7.1. Paraoksonaz-1(PON1) enziminin yapısı

İnsan serum paraoksonaz enzimi; karaciğerde sentezlenen, arildialkilfosfataz olarak da adlandırılan kalsiyum (Ca) bağımlı, HDL ile ilişkili ve 43–45 kDa molekül ağırlıklı bir ester hidrolazdır. Kalsiyum, enzimin hem aktivitesi hem de stabilitesi için gerekmektedir ve katalitik mekanizmada da rol oynamaktadır. Paraoksonazın yapısında bulunan N-terminal hidrofobik sinyal peptidi, HDL ile etkileşim için gerekmektedir. Paraoksonaz enzimi N- terminal hidrofobik sinyal peptidi aracılığı ile fosfolipitlere ve lipoproteinlere bağlanır (**Demirdöğen 2010, Rosenblat ve ark 2011**).

Paraoksonaz enzimi, karaciğer, böbrek, ince bağırsak başta olmak üzere birçok dokuda ve serumda bulunur (**Demirdöğen 2010**). Genetik olmayan faktörler; diyet, akut faz reaktanları, gebelik, hormonlar, sigara kullanımı ve simvastatin tedavisi serum PON1 düzeyini modüle eder. İnsan serum paraoksonaz enziminin iki genetik polimorfizmi bulunmaktadır. Bu iki polimorfizm 55. ve 192. pozisyonlardaki aminoasitlerin değişimi ile ortaya çıkar (**Ekmekçi ve ark 2004**).

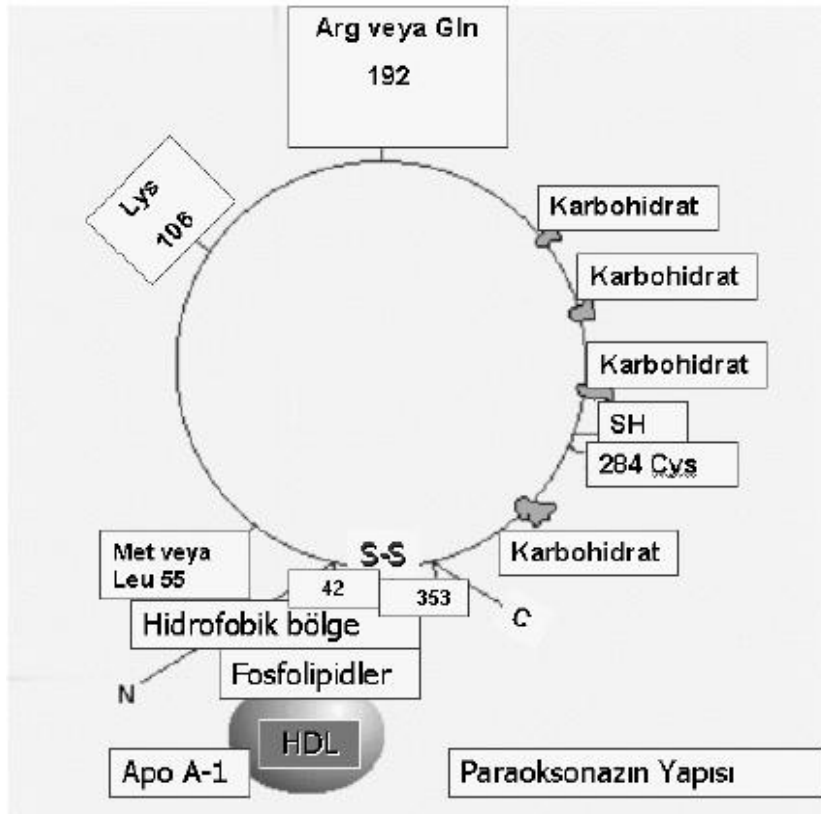
Paraoksonaz aktivitesi, yeni doğanlarda ve prematüre bebeklerde yetişkindekinin yaklaşık yarısı kadardır. Doğumdan yaklaşık bir yıl sonra erişkindeki düzeyine ulaşır ve hayat boyu değişmeden devam eder (**Demirdöğen 2010**).

Paraoksonaz aktivitesi, genellikle paraoksonun substrat olarak kullanıldığı yöntemler ile ölçülür. Enzimin aktivitesi genetik ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir, aktivitenin farklı toplumlarda çok geniş aralıklarda farklı profiller sergilediği gözlenmiştir **(Ekmekçi ve ark 2004)**.

Paraoksonaz enzimi parathionun oksidatif desülfürasyonu ile oluşan paraoksonu hidroliz ederek p-nitrofenol ve dietilfosfat oluşumuna yol açar. Paraokson oluşumu karaciğer ve diğer dokularda mikrozomal sitokrom p-450 enzim sistemi ile kataliz edilmektedir. Paraoksonaz enzim aktivitesi-20°C'de 1 yıl stabildir **(Ekmekçi ve ark 2004, Demirdöğen 2010)**.

Anne sütünde paraoksonaz enzimi aktivitesi ile ilgili yaptığımız araştırmada bir literatür bilgisine rastlamadık.

Şekil-1: PON1 enziminin yapısı (Ekmekçi ve ark 2004)



2.7.2. Paraoksonaz enziminin fonksiyonu

Serum paraoksonaz enziminin, aromatik karboksilik asit esterleri ve paraokson, diazookson, sarin, soman gibi organofosfat türevlerini detoksifiye ettiği pek çok çalışma ile göstermiştir. Paraoksonaz enzimi, paraoksondaki ester bağının hidrolizinden sorumlu olan esterazdır (Demirdöğen 2010).

Tablo -1: İnsan PON1 enziminin substratları (Demirdöğen BC. 2010)

Organofosfatlı bileşiklerin okson metabolitleri	Sinir gazları
Paraokson	- Soman
Metil paraokson	- Sarin
Primifos-metil okson	- Tabun
Klorprifos okson	- Armin
Diazokson	Aromatik laktonlar
Klortion okson	Alifatik laktonlar
Fenitokson	- Dihidroksumarin

Aril (aromatik) esterler	- γ -butirolakton
Fenil asetat	- Homosistein tiolakton
Tiofenilasetat	Siklik karbonatlar
2-naftilasetat	- Prulifloksasin
Fosfolipit hidroperoksitler	

HDL ve LDL'yi oksidasyondan koruyabilme yeteneğine sahiptir. HDL ile ilişkili enzimlerin [PON1, LCAT, T rombosit Aktive Edici Faktör Hidrolaz Platelet (PAF-AH)] oksidatif modifikasyonlara karşı lipoproteinleri koruduğuna inanılmaktadır. Paraoksonaz; LDL'yi, Cu iyonunun ve serbest radikallerin indüklediği oksidasyondan korunmaktadır (**Rye 1999**). HDL yapısında bulunan PON1 enzimi, Minimal Modifiye LDL (MM-LDL)'deki aktif lipitleri yıkar ve böylece arter duvarında yer alan hücrelerde inflamatuvar cevap oluşumuna karşı koruyucu etki gösterebilir. Paraoksonaz, okside LDL'deki kolesterol linoleat hidroperoksitleri ve spesifik okside fosfolipidleri hidroliz eder (**Ekmekçi ve ark 2004, Demirdöğen 2010**).

Paraoksonazın, HDL'de lipit peroksit ve aldehit birikiminin %95'e kadar azaldığı gösterilmiştir. Oksidatif stres altında sadece lipoproteinler değil hücrenin yapısındaki lipitler de lipit peroksidasyonuna uğramaktadır. Paraoksonaz lipit peroksitlerinin aterosjenik etkilerini nötralize ederek hücre membranlarını koruyucu etki gösterir. LDL oksidasyonu esnasında, PON1'in aktive olduğuna ilişkin görüşleri destekleyen çalışmalar vardır. Yapılan bir çalışmada, PON1'in arilesteraz aktivitesinin, LDL oksidasyonu esnasında yaklaşık %50 oranında azaldığı gösterilmiştir (**Ekmekçi ve ark 2004**).

PAF-AH ve PON-1 aynı ortamda bulduklarında MM-LDL'deki aktif lipitleri tek başlarına gösterdikleri etkinin toplamı kadar bir etki ile yıktıklarını göstermiştir. Paraoksonazın yokluğunda PAF-AH ve LCAT, LDL'yi oksidasyondan korumada çok etkili değillerdir. Oksidatif stres altında, HDL'de oksidasyona maruz kalmaktadır. HDL, lipit peroksitlerin serumdaki en önemli taşıyıcısıdır. HDL yapısındaki kolesterol ester hidroperoksitler, LDL'de bulunanlara oranla daha hızlı ancak daha az reaktif hidroksitlere indirgenmektedir. HDL'nin oksidatif modifikasyonu; ters yönde kolesterol taşıma fonksiyonunda bozulmalara yol açar. Paraoksonaz, HDL'yi oksidasyondan koruyarak

HDL ters kolesterol taşıma fonksiyonunun devamını sağlar. Bu durum makrofajlarda kolesterol birikimini engelleyerek köpük hücre oluşumunu ve ateroskleroz gelişimini yavaşlatmaktadır (**Ekmekçi ve ark 2004**).

PON1 aktivitesi yaşa ve cinsiyete bağlı değişim göstermez. Bununla birlikte diyet, sigara, akut faz proteinleri ve gebelik serum PON-1 düzeylerini ve aktivitesini etkiler. DM, hiperkolesterolemi ve kardiyovasküler hastalıklar gibi oksidatif stresin arttığı durumlarda PON1 aktivitesi düşük bulunmuştur. PON1 ve kanser arasındaki ilişki ile ilgili çalışmalara az sayıda vardır. Ancak akciğer, pankreas, mide, meme ve prostat kanserlerinde PON1 düzeyleri düşük olarak bulunmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya 38-42 haftalar arası doğum yapmış, gebelik süresince herhangi bir sağlık sorunu yaşamamış 35 anne'den alınan sütler dahil edildi. Çalışma için Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik kurulunun (2013/323) onayı alındı. Çalışmaya dahil edilen anne sütlerinin:

- Doğum sonrası 5-15 günler arası geçiş sütü olmasına (**Sarı ve ark 2011** yılında kolostrum üzerine çalışma yapmış antioksidan seviyenin değişmediğini tespit etmişler. Bizde geçiş sütünde ve antioksidan etkisi bilinen D vitamini ekleyerek oksidatif düzeyi ölçmeyi amaçladık).

- Sabah ilk süt olmasına dikkat edildi (uzun zincirli çoklu doymamış yağ aside düzeyi en çok sabah ilk sütte mevcut).

- Bebekte ağır RDS , EMR, ağır konjenital malformasyon, doğuştan metabolik hastalık, ciddi sepsis, patolojik sarılık, siyanotik konjenital kalp hastalığı, perinatal asfiksi, renal ve hepatik yetmezlik olması, antioksidan tedavi, diyaliz uygulanan hastalar, annede alkol ve uyuşturucu madde kullanımı, annenin antioksidan tedavi alması, annede diyabet olması durumunda bebekler çalışma dışı bırakıldı.

-Çalışmaya dahil edilen tüm annelerden yazılı onam alındı.

- Annelerden süt kendileri tarafından sağılarak alındı.

-Annelerden alınan 10 cc anne sütü polipropilene tüpe kondu çünkü diğer saklama kaplarında anne sütündeki maddeler yapışabilmektedir (**Goldblum ve ark 1999**). Anne sütleri güneş ışığından korundu.

-Tüm sütler 1 saat içinde toplanıp analiz için biyokimya laboratuvarına gönderildi.

- Annelerden alınan süt üç gruba ayrıldı. Birinci grupta (taze anne sütü) hemen analiz yapıldı. Diğer iki grupta ise 800 Ü. D vitamini eklenip ve eklenmeden -20°C ve -80°C de 72 saat beklendikten sonra analiz edilmek üzere saklandı.

-Anne sütü 3500 devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra, berrak orta tabakadan 1'er cc lik mikro santrifüj (epandorf tüpü) tüpüne kondu. Bir tüpte beklemeden TAS, TOS ve PON-1 düzeyi çalışıldı. Diğer tüplerdeki(1 cc lik) anne sütlerine 800U. D vitamini katılarak -20° ve -80° de saklanmak üzere ışıktan korunarak soğutuculara aktarıldı.72 saat sonra soğutucudan çıkarılarak Benmari metodu ile 15 dakika 35-38°C arasındaki suda bekletildi (**Sari ve ark 2011**). Anne sütü eritildikten sonra TAS, TOS ve PON-1 düzeyine bakıldı.

- Alınan örneklerde TAS, TOS ve PON-1 düzeyleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp fakültesi Biyokimya Merkez laboratuvarında toplu olarak bir defada çalışıldı.

-Numuneler Aboth architect 16000 cihazında çalışıldı.

-PON-1 için C.V. değerleri yüksek aktiviteli PON-1 için: %4.1

- PON-1 için C.V. değerleri orta aktiviteli PON-1 için: %1.7

- PON-1 için C.V. değerleri düşük aktiviteli PON-1 için: %1.5

3.1. Paraoksonaz 1 aktivitesi ölçümü: Paraokson substrat olarak kullanılır ve paraoksonun hidrolizi ile oluşan rengin 412 nm'de, 37°C absorbanı ölçüldü. PON-1 aktivitesi bazal aktivite olarak ölçüldü, sonuçlar U/L olarak verildi.

3.2. Serum total antioksidan durum ölçümü: TAS 2,2'-azino-bis (3-etilbenz-thiazoline-6-sulfonik asid) (ABTS) radikalinin oluşturduğu karakteristik rengin ortama ilave edilen numunedeki antioksidanlar ile açılması esasına dayanan otomatik ölçüm metodu ile belirlendi. Sonuçlar mmol Trolox eivalen/L olarak verildi.

3.3. Serum total oksidan durum ölçümü: Serum TOS düzeyi otomatik ölçüm metodu ile belirlendi. Örnekteki oksidanlar, ferrous iyon-o-dianisidine kompleksini ferik

iyona dönüştürürler. Ferik iyonu asidik ortamda ksilenol oranj ile renkli kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülen rengin yoğunluğu örnekte bulunan oksidan moleküllerin total miktarı ile ilişkilidir. Ölçülen hidrojen peroksit (H₂O₂) ile kalibre edilerek sonuçlar, litrede mikromolar H₂O₂ eşivalanı ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv/L}$) olarak verildi.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme:

Bulguların istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 16.0 (Statistical Package For Social Sciences) paket programı ile yapıldı. Grupların karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren değerler için bağımsız iki örnek t-testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen enzim düzeyleri için, değişkenlikler arasındaki farklılığı belirlemek için nonparametrik Mann-Whitney U testi ve Wilcoxon sıra ortalaması testi kullanıldı. Veriler ortalama değerleri \pm standart sapma (SD) ile birlikte verildi. Testlerin tümünde $p > 0.05$ anlamsız olarak kabul edilirken, $p < 0.05$ anlamlı, $p < 0.01$ çok anlamlı, $p < 0.001$ ileri düzeyde anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya 35 anne sütü dahil edildi. Annelerden alınan süt üç gruba ayrıldı. Birinci grupta taze anne sütü olarak analizi hemen yapıldı. Diğer iki grupta ise 800 Ü. D vitamini katılıp -20°C ve -80°C 72 saat beklenip sonra analiz edilmek üzere saklandı.

TABLO 2: Çalışma grubundaki annelerin(n=35) yaşları ve doğum haftaları, bebeklerin kilo ve doğum haftaları

	ort \pm SD	Minimum	Maksimum
Yaş (yıl)	29.31 \pm 5.96	19	43
Gebelik yaşı (hafta)	38.60 \pm 0.69	38	40
Ağırlık (gram)	3100.00 \pm 367.82	2500	4000
Cinsiyet			
Erkek	21(%60.0)		
Kız	14(%40.0)		

Çalışmada grubundaki 35 annenin en küçüğü 19, en büyüğü 43 yaşında olup yaş ortalamaları ise 29.30 \pm 5.96 olarak belirlenmiştir. Çalışmadaki bebeklerin gebelik haftası en küçüğü 38 en büyüğü 40 haftalık olup gebelik haftası ortalaması 38.6 \pm 0.69 olarak

belirlenmiştir. Doğan bebeklerin en küçüğü 2500 gr. En büyüğü 4000 gr olarak belirlenmiştir. Doğum ağırlığı ortalaması 3100.00 ±367.82 belirlenmiştir. Doğan bebeklerin en küçüğü 5 günlük en büyüğü 14 günlük olup ortalama bebek yaşları 9.7±3.5 olarak tespit edilmiştir. Çalışmadaki annelerin doğan bebeklerin %60 (n=21) erkek ve %40 (n=14) tanesinde kız olduğu tespit edilmiştir.

TABLO3; D vitamini eklenen ve eklenmeyen anne sütündeki TAS düzeyi karşılaştırılması

	ort±SD	Median	Minimum	Maksimum
Taze anne sütü	1.9±1.3	1.85	0.00	4.450
-20°C D vitamini negatif	1.2±1.1	0.95	0.00	3.750
-20°C D vitamini pozitif	0.8±0.9	0.50	0.00	3.275
-80°C D vitamini negatif	1.3±1.1	1.25	0.00	3.750
-80°C D vitamini pozitif	0.9±1.0	0.70	0.00	3.500

Tablo 4; Karşılaştırılan TAS düzeylerinin p değerleri

O,20° D(-)	O, 20° D(+)	O,80° D(-)	O, 80° D(+)	20°D(-) 20°D(+)	80°D(-) 80°D(+)	20°D(-) 80°D(-)	20°D(+) 80°D(+)
0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.008*	0.00*	0.450	0.002*

P<0.05 anlamlı

0: Taze süt ,20⁰: 20⁰C’de saklanan süt, 80⁰:80⁰C’de saklanan süt, D(-): D Vitamini eklenmeyen, D(+): D Vitamini eklenen

Taze anne sütündeki TAS değeri ortalama 1.9 ± 1.3 iken; -20°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TAS değeri 1.2 ± 1.1 olarak belirlenmiştir. Taze anne sütündeki TAS ortalaması -20°C de D vitamini eklenmeyen grup ortalamasından istatistiksel olarak çok anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

Taze anne sütündeki TAS değeri ortalama 1.9 ± 1.3 iken; -20°C de D vitamini eklenen anne sütündeki TAS değeri 0.863 ± 0.98 olarak belirlenmiştir. Taze anne sütündeki TAS ortalaması -20°C de D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak çok anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

Taze anne sütündeki TAS değeri ortalama 1.94 ± 1.39 iken; -80°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TAS değeri 1.367 ± 1.17 olarak belirlenmiştir. Taze anne sütündeki TAS ortalaması -80°C de D vitamini eklenmeyen grup ortalamasından istatistiksel olarak çok anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

Taze anne sütündeki TAS değeri ortalama 1.94 ± 1.39 iken; -80°C de D vitamini eklenen anne sütündeki TAS değeri 0.985 ± 1.074 olarak belirlenmiştir. Taze anne sütündeki TAS ortalaması -80°C de D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak çok anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

-20°C D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TAS ortalaması 1.229 ± 1.19 iken; -20°C D vitamini eklenen anne sütündeki TAS ortalaması 0.863 ± 0.98 olarak belirlenmiştir. -20°C D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TAS ortalaması -20°C D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak çok anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

-80°C D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TAS ortalaması 1.367 ± 1.17 iken; -80°C D vitamini eklenen anne sütündeki TAS ortalaması 0.985 ± 1.07 olarak belirlenmiştir. -80°C D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TAS ortalaması -80°C D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak çok anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

-20°C D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TAS ortalaması 1.229 ± 1.19 iken; -80°C D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TAS ortalaması 1.367 ± 1.17 olarak belirlenmiştir. -20°C D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TAS ortalaması -80°C D vitamini eklenmeyen grup ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$). Ancak rakamsal değer olarak -20°C deki değer daha çok düşmüştür.

-20°C D vitamini eklenen anne sütündeki TAS ortalaması 0.863±0.988 iken; -80°C D vitamini eklenen anne sütündeki TAS ortalaması 0.985±1.07 olarak belirlenmiştir. -20°C D vitamini eklenen anne sütündeki TAS ortalaması -80°C D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak çok anlamlı derecede düşük bulunmuştur (**p<0.05**).

TABLO 5; D vitamini eklenen ve eklenmeyen anne sütündeki TOS düzeyi karşılaştırılması

	ort±SD	Median	Minimum	Maksimum
Taze anne sütü	79.95±39.02	76.45	0.00	200.75
-20°C D vitamini negatif	59.47±60.80	42.90	0.00	215.60
-20°C D vitamini pozitif	65.36±70.25	60.50	0.00	223.00
-80°C D vitamini negatif	36.02±40.89	28.50	0.00	157.30
-80°C D vitamini pozitif	67.99±67.015	47.85	0.00	248.00

Tablo 6; Gruplar arası TOS düzeylerinin karşılaştırılması p değerleri

O, 20°D(-)	O, 20°D(+)	O, 80°D(-)	O, 80°D(+)	20°D(-) 20°D(+)	80°D(-) 80°D(+)	20°D(-) 80°D(-)	20°D(+) 80°D(+)
0.086	0.303	0.000*	0.086	0.465	0.002*	0.028*	0.465

P<0.05 anlamlı

O: Taze süt, 20⁰: 20⁰C'de saklanan süt, 80°:80⁰C'de saklanan süt, D(-): D Vitamini eklenmeyen,

D(+): D Vitamini eklenen

Taze anne sütündeki TOS değeri ortalama 79.95±39.0 iken; -20°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TOS değeri 59.47±60.8 olarak belirlenmiştir. Taze anne sütündeki TOS ortalaması -20°C de D vitamini eklenmeyen grup ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (**p>0.05**).

Taze anne sütündeki TOS değeri ortalama 79.95±39.0 iken; -20°C de D vitamini eklenen anne sütündeki TOS değeri 65.36±70.2olarak belirlenmiştir. Taze anne sütündeki TOS ortalaması -20°C de D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (**p>0.05**).

Taze anne sütündeki TOS değeri ortalama 79.95 ± 39.0 iken; -80°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TOS değeri 36.02 ± 40.8 olarak belirlenmiştir. Taze anne sütündeki TOS ortalaması -80°C de D vitamini eklenmeyen grup ortalamasından istatistiksel olarak çok anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (**$p < 0.05$**).

Taze anne sütündeki TOS değeri ortalama 79.95 ± 39.0 iken; -80°C de D vitamini eklenen anne sütündeki TOS değeri 67.99 ± 67.0 olarak belirlenmiştir. Taze anne sütündeki TOS ortalaması -80°C de D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (**$p > 0.05$**).

-20°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TOS değeri ortalama 59.47 ± 60.8 iken; -20°C de D vitamini eklenen anne sütündeki TOS değeri 65.36 ± 70.2 olarak belirlenmiştir. -20°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TOS ortalaması -20°C de, D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (**$p > 0.05$**).

-80°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TOS değeri ortalama 36.02 ± 40.8 iken; -80°C de D vitamini eklenen anne sütündeki TOS değeri 67.99 ± 67.0 olarak belirlenmiştir. -80°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TOS ortalaması -80°C de D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak çok anlamlı derecede düşük bulunmuştur (**$p < 0.05$**).

-20°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TOS değeri ortalama 59.47 ± 60.8 iken; -80°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TOS değeri 36.02 ± 40.8 olarak belirlenmiştir. -20°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki TOS ortalaması -80°C de D vitamini eklenmeyen grup ortalamasından istatistiksel olarak çok anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (**$P < 0.028$**).

-20°C de D vitamini eklenen anne sütündeki TOS değeri ortalama 65.36 ± 70.2 iken; -80°C de D vitamini eklenen anne sütündeki TOS değeri 67.99 ± 67.0 olarak belirlenmiştir. -20°C de D vitamini eklenen anne sütündeki TOS ortalaması -80°C de D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (**$p > 0.05$**).

TABLO 7: D vitamini eklenen ve eklenmeyen anne sütündeki PON-1 düzeyi karşılaştırılması

	ort±SD	Median	Minimum	Maksimum
Taze anne sütü	0.75±1.71	0.00	0.00	7.95
-20°C D vitamini negatif	0.37±1.27	0.00	0.00	6.82
-20°C D vitamini pozitif	0.40±1.17	0.00	0.00	5.76
-80°C D vitamini negatif	0.19±1.74	0.00	0.00	3.39
-80°C D vitamini pozitif	0.29±1.042	0.00	0.00	5.03

Tablo 8; Karşılaştırılan PON-1 düzeylerinin p değerleri

O, 20°D(-)	O, 20°D(+)	O, 80°D(-)	O, 80°D(+)	20°D(-) 20°D(+)	80°D(-) 80°D(+)	20°D(-) 80°D(-)	20°D(+) 80°D(+)
0.083	0.564	0.021*	0.021*	0.705	1.000	0.705	0.705

P<0.05 anlamlı

O: Taze süt, 20⁰: 20°C'de saklanan süt, 80°:80°C'de saklanan süt, D(-): D Vitamini eklenmeyen,

D(+): D Vitamini eklenen

Taze anne sütündeki PON değeri ortalama 0.75±1.7 iken; -20°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki PON değeri 0.37±1.2 olarak belirlenmiştir. Taze anne sütündeki PAN ortalaması -20°C de D vitamini eklenmeyen grup ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (**p>0.05**).

Taze anne sütündeki PON değeri ortalama 0.75±1.7 iken; -20°C de D vitamini eklenen anne sütündeki PON değeri 0.40±1.1 olarak belirlenmiştir. Taze anne sütündeki PON ortalaması -20°C de D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (**p>0.05**).

Taze anne sütündeki PON değeri ortalama 0.75±1.7 iken; -80°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki PON değeri 0.19±1.74 olarak belirlenmiştir. Taze anne sütündeki PON ortalaması -80°C de D vitamini eklenmeyen grup ortalamasından istatistiksel olarak çok anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (**p<0.05**).

Taze anne sütündeki PON değeri ortalama 0.75±1.7 iken; -80°C de D vitamini eklenen anne sütündeki PON değeri 0.29±1.0 olarak belirlenmiştir. Taze anne sütündeki

PON ortalaması -80°C de D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak çok anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (**p<0.05**).

-20°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki PON değeri ortalama 0.37 ± 1.2 iken; -20°C de D vitamini eklenen anne sütündeki PON değeri 0.40 ± 1.1 olarak belirlenmiştir. -20°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki PON ortalaması -20°C de D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (**p>0.05**).

-80° de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki PON değeri ortalama 0.19 ± 1.74 iken; -80° de D vitamini eklenenanne sütündeki PON değeri 0.29 ± 1.0 olarak belirlenmiştir. -80°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki PON ortalaması -80°C de D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (**p>0.05**).

-20°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki PON değeri ortalama 0.37 ± 1.2 iken; -80°C de D vitamini eklenmeyen anne sütündeki PON değeri 0.19 ± 1.74 olarak belirlenmiştir. -20°C de D vitamini katılmayan anne sütündeki PON ortalaması -80°C de D vitamini eklenmeyen grup ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (**p>0.05**).

-20°C de D vitamini eklenen anne sütündeki PON değeri ortalama 0.40 ± 1.1 iken; -80°C de D vitamini eklenen anne sütündeki PON değeri 0.29 ± 1.0 olarak belirlenmiştir. -20°C de D vitamini eklenen anne sütündeki PON ortalaması -80°C de D vitamini eklenen grup ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (**p>0.05**).

5. TARTIŞMA

Anne sütünün tüm bebekler için vazgeçilmez eşsiz bir besin kaynağıdır. Emzirme anne sütünün içeriğinden ayrı olarak anne ve bebek sağlığına kısa ve uzun dönemde bir çok yararlar sağlar. Ancak bebeğin anneden ayrı olduğu, bebeğin emme ve yutma koordinasyonunun gelişmediği prematürelilik durumunda, annenin bebeğini emziremeyeceği kronik hastalık veya ilaç kullanma durumlarında veya annenin çalışma hayatı nedeniyle bebeğinden ayrı kaldığı zamanlarda sağılmış anne sütünün kullanılması çok önemlidir. Bu nedenle bazen anne sütünün oda sıcaklığında saklanma süresini aşan dönemlerde saklanması gerekebilir. Saklanma koşullarında optimal saklama sürelerine uyulması önemlidir. Saklanma sırasında anne sütünün antioksidan özelliklerinde değişme olup olmadığı sorusu bebeğin anne sütünü almasını etkilememesine rağmen önemli bir merak konusudur. Biz bu çalışmada anne sütünü saklamanın ve D vitamini eklemenin saklama sürecinde oksidatif strese ve antioksidan düzeye etkisini araştırmayı amaçladık.

Biz bu çalışmada 5-15. günlerdeki geçiş sütünü; taze süt ve -20°C ve -80°C 'de D vitamini ekleyerek ve D vitamini eklenmeden 72 saat saklama dönemi sonunda anne sütündeki antioksidan, oksidan ve paroksonaz düzeylerini değerlendirdik. Taze anne sütündeki antioksidan düzeyinin, 72 saat sonra çalışıldığında taze anne sütününe göre azaldığı görüldü. İstatiksel olarak çok anlamlı bulundu. Bu bulgu literatürle uyumlu idi (**Sarı ve ark 2011**). Taze anne sütününde anne sütünün antioksidan özellikleri en yüksek düzeyde bulunmaktadır. Ancak literatürde paraoksonaz düzey tayini yaparak yapılan karşılaştırmaya rastlamadık. 800Ü. D vitamini eklenerek dondurulan anne sütündeki antioksidan düzeyindeki düşme daha fazla oldu ve istatiksel olarak çok anlamlı bulundu. Bu sonuçlara dayanarak D vitaminin anne sütününe eklendiğinde antioksidan etkisinin ortaya çıkmadığı ve anne sütününe D vitamini eklenmeden -80°C de saklandığında antioksidan etkinin -20°C ye göre daha az azaldığı görülmüştür.

Buzdolabında bekletme, dondurma ve depolama süresi ile anne sütünün içindeki antioksidan enzimlerin, nasıl etkilendiği konusunda farklı araştırma sonuçları vardır. Taze anne sütünün, en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu bilinmektedir. Anne sütündeki antioksidan kapasiteyi korumada; dondurmanın, buzdolabında bekletmekten daha uygun olduğunu belirten çalışmalar vardır (**Miranda ve ark 2004**). Ancak, dondurmanın antioksidan kapasiteyi azalttığı, buzdolabında bekletmenin TAK düzeyini

dondurmaktan daha az etkilediğini, 48 saatten uzun süre dondurmanın antioksidan kapasiteyi daha fazla azalttığını gösteren bilgiler de bulunmaktadır (**Hanna ve ark 2004**). Glutasyon, antioksidan ve detoksifikasyon özelliklerine sahiptir. Anne sütünün glutasyon düzeyi, laktasyon günü arttıkça azalmaktadır. Anne sütünün; 2 saat süreyle, oda ısısında, +4 °C’de ve -20 °C’de bekletmekle glutasyon düzeyinin %70-80 arasında azaldığı gösterilmiştir (**Ankrah ve ark 2000**). Biz çalışmamızda bir etkiside glutasyonu arttırarak antioksidan etkisi gösterilen D vitaminini anne sütüne ekleyerek oksidan, antioksidan düzeyini ölçtük. D vitamini eklenmesi sonucu oksidan düzeyin arttığını ve antioksidan düzeyin azaldığını tespit ettik.

Yeni doğmuş bebekler laktasyonun ilk haftasında oksidatif hasara en çok maruz kaldığı dönemdir. Kolosturum içeriği bu yeni ortama ve oksidatif hasara karşı tüm yönleriyle koruyacak, en faydalı antioksidandır. Yapılan bir çalışmada +4°C’ de 24 saat ve -20°C’de 10 gün saklanmış anne sütündeki glutasyon peroxidaz(GPx) ve malondialdehit(MDA) düzeyleri ve lipid peroxidasyonları değerlendirilmiş. Antioksidan düzeyinin korunması açısından donmanın, soğutmadan uygun olacağı söylenmiştir (**Miranda ve ark 2004**). Biz çalışmamızda daha sağlıklı sonuç elde etmek için anne sütündeki yalnız iki parametere değil toplam antioksidan düzeyini ölçtük ve taze anne sütünde antioksidan düzeyin en yüksek olduğu, dondurma ile antioksidan düzeyinin azaldığını tespit ettik.

Taze anne sütü ve -80°C’ de dondurulup 2 ay saklanan anne sütündeki antioksidan ve oksidan düzeyinin bakıldığı başka bir çalışmada kolosturumdaki antioksidan ve oksidan düzeyinin azalmadığı gösterilmiştir. Bakılan geçiş ve olgun sütteki antioksidan düzeyi belirgin azalmış ve istatikselsel olarak çok anlamlı sonuç çıkmıştır. Oksidan düzeyinde istatikselsel ve oransalsel olarak düşüş görülmemiştir. Çalışmanın sonucu olarak -80°C’ nin anne sütünü saklamak için uygun bir sıcaklık olmadığı sonucuna varılmıştır (**Sari ve ark 2012**). Bizim çalışmamızda oksidan düzeyde -80°C’de D vitamini eklenmeyende oransalsel ve istatikselsel düşüş tespit ettik. Bu ısıda D vitamini eklenende oksidatif stres düzeyinde oransalsel ve istatikselsel olarak oksidan düzeyde artış tespit ettik. Antioksidan düzey açısından, çalışmamızda -20°C’de ki antioksidan düzeyi -80°C’ye göre daha çok azaldığı tespit edildi. D vitamini eklenen anne sütlerinde de her iki ısıda D vitamini eklenmeyenlere göre oransalsel ve istatikselsel olarak antioksidan düzeyi belirgin düştüğü tespit edildi. Bunun

sonucunda D vitamini eklemenin, eklenmeyen anne sütüne göre antioksidan seviyeyi belirgin azalttığı ve oksidatif stresi belirgin arttırdığını tespit ettik.

30 sağlıklı anne sütü analiz edilip, total antioksidan kapasite, malondialdehit ve pH değerlerine 24, 36, 48, 72 ci saatlerde analiz edilen başka bir çalışmada, pH' nın ilk baştan kademeli olarak azaldığı ve antioksidan düzeyide ilk 24 saatten sonra azaldığı görülmüştür. Çalışmanın sonucunda eğerki anne sütü saklanmak zorunda kalırsa 24 saatten daha kısa sürede tüketilmesini, antioksidan düzeyi açısından önermektedirler (**Miranda 2011**). Bizde çalışmamızda total antioksidan kapasiteyi değerlendirdik ve dondurulduğunda anne sütünde antioksidan düzeyin azaldığını tespit ettik.

Anne sütü ile formül mamaların karşılaştırıldığı başka bir çalışmada lipit peroksidasyon ürünleri anne sütünde formül mamalara göre yüksek bulunmuştur. Bunlar -20°C de saklanarak antioksidan düzeyleri karşılaştırılmış ve anne sütünde antioksidan kapasite düşüşü istatistiksel olarak çok anlamlı bulunmuş ancak düşse bile formül mamalara göre antioksidan düzeyi yine anne sütünde daha yüksek bulunmuştur. Anne sütündeki bu antioksidan kapasite düşüşünü lipoprotein lipaz aktivitesi nin -20°C var olduğu ve bunun sonucu olarak serbest yağ asitlerinin artmasını göstermişler (**Turoli ve ark 2004**). Bizim çalışmamızda da dondurularak saklanan anne sütündeki antioksidan düzeyi taze anne sütüne göre düşük düzeyde tespit edildi

Çalışma grubunda bebekleri term bebek olan anne sütlerini seçtik. Daha önce kolostrumda TAS, TOS değerleri çalışılmış ve herhangi bir fark görülmemiş. Prematüre bebeklerinde doğum sonrası tam gelişmemiş vücut fonksiyonları ve dış ortama adaptasyonu nedeni ile oksidatif stress artmakta olduğunu gösteren çalışmalar mevcut. Bu nedenle tüm bebekleri term bebek olan anne sütlerini aldık. Ancak vaka sayımız sınırlı olduğu için ayrıca gebelik haftalarına göre alt gruplara ayırarak analiz yapamadık.

Anne sütlerini aynı günlerde ve saatlerde aldık. Çünkü anne sütü doğum sonu günlerde antioksidan özellikler yönünden farklılık gösterebilir (**Aydın ve ark 2009**). 3-7-28. Günlerde anne sütünün analiz ettiklerinde kolosturumda koruyuculuğun ve total protein, albümin, trigliserid, total kolesterol, demir, demir bağlama kapasitesi, magnezyum ve fosfor oranın geçiş ve devam anne sütüne göre fazla olduğunu göstermişler. Yapılan çalışmalar, emzirmenin başlangıcında karbonhidrattan zengin süt (foremilk) ile

emzirmenin sonundaki yağdan zengin sonsütün (hindmilk) içerik açısından birbirinden farklı olduğunu göstermiştir.

Yüksek doz D vitamin anne sütünde reaksiyona girerek antioksidan etkisi olan C, E vitamin ve selenyumun etkisini azaltabildiği tespit edilmiştir.

Oksidatif stres düzeyinde, istatistiksel ve oransal olarak -80°C ' de belirgin düşüş tespit edildi ve çok anlamlı bulundu. Bunun yanında -80°C 'de D vitamini eklenen anne sütünde oksidatif düzey belirgin yüksek tespit edildi. D vitamininin anne sütüne eklendiğinde oksidatif stres düzeyini arttırdığı tespit edildi.

PON-1 düzeyleri açısından karşılaştırdığımızda taze anne sütü ile -20°C arasında istatistiksel fark görülmediğini, taze anne sütü ile -80°C de D vitamini eklenen ve eklenmeyen arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulduk. Daha önce anne sütünde paroksonaz düzeyi ile ilgili yapılmış literatür bilgisine rastlamadık.

Yapılan başka bir çalışmada ise; anne sütünü dondurmanın antioksidan kapasiteyi azalttığı, buzdolabında bekletmenin dondurmaktan daha az etkilediği, 48 saatten uzun süre dondurmanın antioksidan kapasiteyi daha fazla azalttığı görülmüştür (**Hanna ve ark 2004**). Aynı çalışmada; anne sütünü 48 saat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletmek ile, antioksidan kapasitenin taze süte göre azaldığı ancak istatistiksel fark olmadığı belirtilmiştir. Çalışmamızdaki bulgulara göre; en yüksek antioksidan düzeyi, taze anne sütünde mevcuttur. Antioksidan düzeyi; 72 saat -20°C ve -80°C 'de bekletilmiş sütlerde, D vitamini eklenen ve eklenmeyende de değer olarak belirgin olarak azalmış ve istatistiksel olarak anlamlıdır. Antioksidan düzeyi yönünden; bebeğe taze anne sütü verilmesi, mümkün değilse anne sütüne D vitamini eklenmeden sade olarak -80°C 'de en fazla 72 saat saklanarak kullanılması önerilebilir.

6. SONUÇLAR

1. TAS en yüksek taze anne sütünde ölçüldü. Yetmiş iki saat bekletildiğinde -20°C deki düzeyi -80°C ye göre oransal olarak daha fazla düşüş görüldü. D vitamini eklendiğinde TAS düzeyinin daha çok azaldığı görüldü. Anne sütü saklanması -80°C de ve D vitamini eklenmesinin yapılmasının daha uygun olduğu görüldü.

2. TOS en yüksek taze anne sütünde ölçüldü. Yetmiş iki saat bekletildiğinde -20°C deki TOS düzeyi anne sütü ile çok fark yoktu, ancak -80°C de taze anne sütüne göre azaldığı gözlemlendi. D vitamini eklenenlerde TOS düzeyi -80°C de en yüksek seviyede ölçüldü. D vitamini eklenmesi ile oksidatif stresin arttığı tespit edildi. Bu da anne sütünün saklanması -80°C de ve D vitamini eklenmesinin yapılmasının daha uygun olduğunu düşündürdü.

3. PON-1 en yüksek taze anne sütünde ölçüldü. Yetmiş iki saat bekletildiğinde -20°C deki D vitamini eklenen ve eklenmeyen ile taze anne sütündeki PON-1 düzeyi ile fark yoktu, ancak -80°C de D vitamini eklenen ve eklenmeyen anne sütündeki PON-1 düzeyinin taze anne sütüne göre istatistiksel olarak çok azaldığı görüldü.

4. Sonuçlarımız antioksidan olarak anne sütünün taze ve D vitamini katkısı olmadan tüketilmesinin en uygun olduğunu düşündürmektedir.

5. Anne sütünün -80°C'de D vitamini eklenmeden saklanması daha uygun olduğu gözükmektedir.

6. D vitamininin miktarı anne sütünde yetersiz olması ve antioksidan etkisinden yararlanmak için anne sütüne katılmadan D vitamini verilmesinin tavsiye ediyoruz.

7. KAYNAKLAR

- Ahearn TU, Mc Cullough ML, Flanders WD, Long Q, Sidelnikov E, Fedirko V. et al. A randomized clinical trial of the effects of supplemental calcium and vitamin D3 on markers of their metabolism in normal mucosa of colorectal adenoma patients. 2011 15;71(2): 413-23.
- Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. baskı. Konya: Mimoza yayınları, 1995.
- Anderson ME, Meister A. Glutathione monoesters. J Anal Biochem. 1989;183(1): 16-20.
- Ankrah NA, Appiah-Opong R, Dzokoto C. Human breastmilk storage and the glutathione content. J Trop Pediatr 2000; 46(2):111-3
- Aydın İ, Özgürtaş T, Turan Ö, Koç E, Hırfanoğlu M.İ, Açıkel H.C. et al. Preterm ve Term Yenidoğanların Anne Sütünün Biyokimyasal Karşılaştırması. Türk Biyokimya Dergisi. 2009; 34(4): 242-249
- Balcı E. Anne Sütünün Çocuk Büyüme ve Gelişmesine Etkisi. Türk Aile Hekimliği Dergisi. 2011;15(3): 135-13
- Bayır H, Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin V, Ruppel RA, Adelson PD, et al. Assessment of antioxidant reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. Pediatr Res 2002;51: 571-8.
- Beaudry M, Dufour R, Marcoux S. Relation between infant feeding and infections during the first six months of life. J Pediatr 1995;126: 191-197.
- Bouillon R, Camelié G, Daci E, Seagart S, Verstuyf A. Vitamin D Metabolism and Action. Osteoporos Int 1998; 8: 13-9.
- Buhimschi IA, Buhimschi CS, Pupkin M, Weiner CP. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. Am J Obstet Gynecol 2003;189: 181-8.
- Cannell JJ. Autism, will vitamin D treat core symptoms? Med Hypotheses.2013;81(2): 195-8
- Cirak B, İnci S, Palaoglu S, Bertan V. Lipid peroxidation in cerebral tumors. Clin Chim Acta 2003; 327: 103-7.

- Coşkun T. Çocuk Beslenmesinde Temel İlkeler, Anne sütü ve anne sütü ile beslenme. *Katkı Pediatri Dergisi*.1996;1: 7-37 -a.
- Coşkun T. Çocuk Beslenmesinde Temel İlkeler. Anne sütü ile beslenme. *Katkı Pediatri Dergisi* 2003; 2: 168-183. -b
- Dani C, Mertelli E, Bertini G. et al. Plasma bilirubin level and oxidative stress in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2003; 88(2): 119-23.
- Demirdöğen BC. Organofosfatlı pestisit zehirlenmeleri ve serum paraoksonaz 1 (PON1) enziminin organofosfat metabolizmasındaki rolü. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2010;67(2): 97- 112.
- Ekmekçi ÖB, Donma O, Ekmekçi H. Paraoksonaz.*Cerrahpaşa Tıp Dergisi*.2004;35: 78–82.
- Engedal N, Ertesvag A, Blomhoff HK. Survival of activated human T lymphocytes is promoted by retinoic acid via induction of IL-2. *Int Immunol* 2004;16(3) :443-53.
- Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38: 1103-11.
- Evans TJ, Ryley HC, Neale LM, Dodge JA, Lewarne VM. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk. *Arch Dis Child* 1978; 53(3): 239-41.
- Ezz El Din ZM, Abd El Ghaffar S, El Gabry EK, Fahmi WA, Bedair RF. Is stored expressed breast milk an alternative for working Egyptian mothers? *East Mediterr Health J* 2004;10 (6): 815-21.
- Farinotti M, Vacchi L, Simi S, Di Pietrantonj C, Brait L, Filippini G. Dietary interventions for multiple sclerosis *Cochrane Database Syst Rev*. 2012; 12: CD004192.
- Fedirko V, Bostick RM, Long Q, Flanders WD, McCullough ML, Sidelnikov E et.al. Effects of supplemental vitamin D and calcium on oxidative DNA damage marker in normal colorectal mucosa: a randomized clinical trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 ;19(1): 280-91.
- Friel JK, Friesen RW, Harding SV, Roberts LJ. Evidence of oxidative stress in full term healthy infants. *Pediatr Res* 2004;56(6): 878-88.
- Gathwala G, Sharma S. Oxidative stress, phototherapy and the neonate. *Indian Pediatr* 2000;67(11): 805-8.

- Gitto E, Pellegroni S, Gitto P, Barberi I, Reiter RJ. Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J Pineal Res* 2009;46: 128-39.
- Goldblum RM, Garza C, Johnson CA, Harrist R, Nichols BL, Goldman AS. Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. *Acta paediatr* 1999 volume 88; 1: 14-18
- Goldman AS. The immune system of human milk: Antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12: 664-672.
- Gür E. Anne sütü ile Beslenme. *Türk Pediatri Arşivi* 2007; 42 Özel Sayı: 11-5.
- Halicka HD, Zhao H, Li J, Traganos F, Studzinski G. P, Darzynkiewicz Z. Attenuation of constitutive DNA damage signaling by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Aging (Albany NY)*, 2012;4(4): 270-8
- Hamosh M, Ellis LA, Pollock DR, Henderson TR, Hamosh P. Breastfeeding and the working mother: effect of time and temperature of short-term storage on proteolysis, lipolysis, and bacterial growth in milk. *Pediatrics* 1996; 97(4): 492-8.
- Hanna N, Ahmed K, Anwar M, Petrova A, Hiatt M, Hegyi T. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89(6): 518-20
- Heijmans BT, Westendorp RGJ, Lagaay AM, Knook DL, Kluit C, Slagboom PE. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis* 2000;149: 91-97.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357(3): 266-81
- Hung JH. Oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *J Chin Med Assoc* 2007;70(10): 430-2.
- İkizoğlu Ö.Y, Kırmaz C, Kasırga E, Yüksel H. Pediatride İmmünnütrisyon Astım Allerji İmmünoloji 2005;3(3):148-157.
- Igumbor EO, Mukura RD, Makandiramba B, Chihota V. Storage of breast milk: effect of temperature and storage duration on microbial growth. *Cent Afr J Med* 2000; 46(9): 247-51.
- Jelsen RG, Ferris AM, Lammi-Keefe CJ. Lipids in human milk and infant formulas. *Anna Rev Nutr* 1992;12: 417-41
- Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp dergisi*, 2002; 33:110-118.

- Korkmaz A, Yurdakök M, Oran O, Tekinalp G. Hiperbilirubinemili yenidoğan bebeklerde serum bilirubin ve ürik asit düzeyleri arasındaki denge. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2001;44: 338-41.
- Köksal N, Akpınar R, Köse H, Sayrım K. Prematüre ve Yenidoğan Beslenmesi. *Güncel Pediatri Dergisi* 2003; 1: 59-72
- Kunz C, Lönnerdal B. Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. *Acta Paediatrica*. 1992;81(2):107-112.
- Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney PH. Vitamin and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(6):1586-91.
- Lawrence RA. Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. *Acta Paediatrica Suppl* 1999; 88(430):14-8.
- Mahon BD, Wittke A, Weaver V, Cantora MT. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem* 2003 1;89(5):922-32.
- McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical Biochemistry* 1993;26: 351-7.
- Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Bosch-Morell F, et al. Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. *Biofactors* 2004; 20(3):129-37.
- Morrow A.L, Rangel J.M.; Human Milk Protection Against Infectious Diarrhea: Implications for Prevention and Clinical Care. *Semin Paediatr Infect. Dis.* 2004;15(4): 221-8.
- Miranda M, Gormaz M, Romero FJ, Silvestre D. Stability of the antioxidant capacity and pH of human milk refrigerated for 72 hours: longitudinal study. *Nutr Hosp.* 2011;26 (4):722-728.
- Naito Y, Lee MC, Kato Y, Nagai R, Yonei Y. Oxidative stress markers. *Anti-Aging Medicine* 2010;7(5):36-44.
- Nemere I, Farach-Carson MC. Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 248(3): 443-9.
- Neyzi O, Ertuğrul T. *Pediyatri*. 4 th ed. İstanbul: Nobel Matbaacılık;2010 :211-22

- Köksal N, Akpınar R, Köse H, Sayrım K. Prematüre ve yenidoğan beslenmesi. *Güncel Pediatri* 2003;1:59-72
- Hanna N, Ahmed K, Anwar M, Petrova A, Hiatt M, Heqyi T. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004;89(6): F518–F520.
- Öngen B, Kabarooğlu C, Parıldar Z. D Vitamini'nin Biyokimyasal ve Laboratuvar Değerlendirmesi. *Türkiye Klinik Biyokimya Derg* 2008; 6(1): 23-31.
- İkizoğlu Ö.Y, Kırmaz C, Kasırğa E, Yüksel H. Pediatride İmmünnütrisyon Astım Allerji İmmünoloji 2005;3(3):148-157.
- Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *TIBS* 2000;25: 502-7
- Rao GM, Rao AV, Raja A, Rao S, Rao A. Lipid peroxidation in brain tumours. *Clinica Chimica Acta* 2000;302: 205-11.
- Robien K, Cutler GJ, Lazovich D. Vitamin D intake and breast cancer risk in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Cancer Causes Control.*2007;18(7): 775-82.
- Robles R, Palomino N, Robles A. Oxidative stress in the neonate. *Early Human Dev.* 2001;Suppl: 75–81.
- Rollison DE, Cole AL, Tung KH, Slattery ML, Baumgartner KB, Byers T, et al. Vitamin D intake, vitamin D receptor polymorphisms, and breast cancer risk among women living in the southwestern U.S. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(2): 683-91.
- Saedisomeolia A, Taheri E, Djalali M, Djazayeri A, Qorbani M, Rajab A, et al. Vitamin D status and its association with antioxidant profiles in diabetic patients: A cross-sectional study in Iran. *Indian J Med Sci.* 2013; 67(1-2): 29-37.
- Salum E, Kals J, Kampus P, Salum T, Zilmer K, Aunapuu M, et al. Vitamin D reduces deposition of advanced glycation end-products in the aortic wall and systemic oxidative stress in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013;100(2): 243-9.
- Sari F.N, Akdağ A, Dizdar E.A, Uras N, Erdevе Ö, Erel Ö et al. Antioxidant capacity of fresh and stored breast milk: is -80°C optimal temperature for freeze storage? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25(6): 777-82

- Scandalios JG: The rise of ROS. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2002; 27: 483-486.
- Traverse JH, Nesselov YE, Crampton M, Linstrom P, Thomas DD, Bache RJ. Measurement of myocardial free radical production during exercise using EPR spectroscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290(6):2453-8.
- Turoli D, Testolin G, Zanini R, Bellù R. Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paediatrica*. 2004; 93(12):1569-74.
- Tümay Sözen. D hormonu: Güncel gelişmeler, *Hacettepe Tıp Dergisi* 2011; 42:14-27.
- Ünsal H, Atlıhan F, Özkan H, Targan Ş, Hassoy H. Toplumda Anne Sütü Verme Eğilimi ve Buna Etki Eden Faktörler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*.2005;48:226-233.
- Vatansever Ü, Duran R, Acunaş B. Tek Başına Anne Sütü ile Beslenen Bebeklerde Hipernatremik Dehidratasyon. *Balkan Medical Journal*. 2007; 24(3):190-193
- Vlachos GD, Bartzeliotou A, Schulpis KH, Partsinevelos GA, Lazaropoulou C, Papadima C, et al. Maternal-neonatal serum paraoxonase 1 activity in relation to the mode of delivery. *Clin Biochem* 2006;39: 923-8.
- Wiedemann M, Kontush A, Finckh B , Hellewege H.H, Kohlschütter A.Neonatal blood plasma is less susceptible to oxidation than adult plasma owing to its higher content of bilirubin and lower content of oxidizable Fatty acids. *Pediatr Res*. 2003; 53(5): 843-9.
- Wiesman H. Vitamin D is a membrane antioxidant, ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action *FEBS Lett*. 1993;326(1-3): 285-8.
- Wijnberger LDE, Krediet TG, Visser GHA, Van Bel F, Egberts J. Early neonatal antioxidant capacity after preexisting impaired placental function. *Early Hum Dev* 2003;71: 111-6.
- Yesilkaya A, Altınayak R, Korgun DK. The antioxidant effect of free bilirubin on cumene-hydroperoxide treated human leukocytes. *Gen Pharmacol*. 2000; 35(1): 17-20.
- Yiğit S, Yurdakök M, Kilin K ve ark Yenidoğanlarda serbest radikallere bağlı hastalıklar. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 1997; 39: 749-65.
- YU BP. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*.1994; 74(1): 139-162.