

156582

T.C
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD
Yenidoğan Bilim Dalı

**GEBELİKTE SİGARA KULLANIMININ ANNELERİN VE YENİDOĞAN
BEBEKLERİNİN OKSİDAN/ANTİOKSİDAN DURUMLARINA
ETKİLERİ**

Yrd. Doç. Dr. Bahri Ermiş

**Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Rahmi Örs**

**Yandal Uzmanlık Tezi
Erzurum, 2004**

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ABD
YENİDOĞAN BİLİMDALİ

GEBELİKTE SİGARA KULLANIMININ ANNELERİN VE
YENİDOĞAN BEBEKLERİNİN OKSİDAN/ANTIOKSİDAN
DURUMLARINA ETKİLERİ

Yrd. Doç. Dr Bahri Ermiş

Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi : 26.03.2002
Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi : 26.03.2004
Uzmanlık Sınav Tarihi : 02.04.2004

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Rahmi Örs
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Cahit Karakelleoğlu
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Sevin Altınkaynak
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Naci Ceviz
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Zühal Umudum
Anabilim Dalı Başkanı : Prof. Dr. Cahit Karakelleoğlu

Nisan 2004
ERZURUM

İÇİNDEKİLER

	<i>Sayfa No</i>
Onay	iii
Teşekkür	iv
Türkçe Özet	v
İngilizce Özet	vi
Kısaltmalar	vii
Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	2
Serbest Radikaller	2
<i>Superoksid Radikali</i>	2
<i>Hidroksil Radikali</i>	3
<i>Singlet Oksijen</i>	3
<i>Hidrojen Peroksit</i>	3
<i>Diğer Radikaller</i>	4
Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri	4
<i>Membran Lipitlerine Etkileri</i>	5
<i>Proteinlere Etkileri</i>	5
<i>Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri</i>	5
<i>Karbonhidratlara Etkileri</i>	6
<i>Hücre Dışı Etkileri</i>	6
Serbest Radikallerin Yararlı Etkileri	6
Antioksidan Mekanizmalar	7
Enzim Olan Antioksidanlar	7

<i>Superoksid Dismutaz</i>	7
<i>Glutasyon Peroksidaz</i>	8
<i>Katalaz</i>	9
<i>Mitokondrial Sitokrom Oksidaz</i>	9
Enzim Olmayan Antioksidanlar	10
<i>Vitamin E</i>	10
<i>Vitamin C</i>	10
<i>β-karoten</i>	10
<i>Melatonin</i>	10
<i>Glutasyon</i>	11
<i>Selenyum</i>	11
Gereç ve Yöntem	12
Çalışma Grupları	12
Çalışmaya Alınmama Kriterleri	12
Biyokimyasal Testler	12
<i>Malondialdehid (MDA)</i>	12
<i>Glutasyon Peroksidaz (GPx)</i>	14
<i>Superoksid Dismutaz (SOD)</i>	15
İstatistiksel Testler	17
Bulgular	18
Tartışma	23
Sonuçlar	26
Kaynaklar	27

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Anabilim Dalları Kurulu'nun toplantısında; "Gebelikte Sigara Kullanımının Annelerin ve Yenidoğan Bebeklerinin Oksidan/Antioksidan Durumlarına Etkileri" başlıklı çalışması Yrd. Doç. Dr. Bahri Ermiş'e Yandal uzmanlık tezi olarak verilmesine ve tez yönetiminin Doç. Dr. Rahmi Örs tarafından yürütülmesine karar verildi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 09.05.2003 tarih ve 41 sayılı kararıyla ilgili tezin etik kurul onayı alındı.



TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında bilgi ve deneyimleri ile bana katkıda bulunan tez hocam sayın Doç. Dr. Rahmi Örs'e, Yandal uzmanlığım süresince yardımlarını yakından hissettiğim sayın Prof. Dr. Cahit Karakelleoğlu, Doç. Dr. Behzat Özkan, Doç. Dr. Naci Ceviz, Yrd. Doç. Dr. Ayhan Taştekin'e, deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen Biyokimya AB Dalı öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Fatih Akçay ve Arş. Gör. Dr. Abdülkadir Yıldırım'a, Erzurum'da beni yalnız bırakmayan, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ağabeyim Necati Ermiş, eşim Ayşe Ermiş ve çocuklarım Alper, Fatih ve Zeynep'e sonsuz teşekkür ederim.

Yrd.Doç. Dr. Bahri ERMİŞ



ÖZET

Oksidatif stres, gebelik ve gebeliğe ait komplikasyonlar dahil olmak üzere, bazı fizyolojik ve patolojik olaylarda rol aldığı bildirilmektedir. Sigara kullanan erişkinlerde antioksidan savunma sistemlerinin bozulduğunu gösteren bir çok çalışma olmasına rağmen; sigaranın gebe kadınlar ve yenidoğan bebekleri üzerine olan oksidatif etkilerini araştıran birkaç çalışma vardır.

Bu çalışmanın amacı aktif sigara içen, pasif olarak sigaraya maruz kalan ve sigara içmeyen gebe kadınlarda ve yenidoğan bebeklerinde serum malondialdehid (MDA) düzeyleri, superoksid dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerini araştırmaktır.

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesinde doğum yapmış 41 anne ve 7 günlük bebekleri çalışmaya alındı. Doğum kayıtları ve annelerle karşılıklı görüşmeler sonucu 41 anne ve bebeği çalışmaya alındı; sigara içen grup (n=12), anne (5-10 sigara/gün) ve baba (20 sigara/gün) sigara kullanıyor idi; pasif sigara içiciler (n=14), yalnız baba evde sigara içiyor idi (20 sigara/gün); sigara içmeyen grup (n=15), gebelikten önce ve gebelikte evde hiç kimse sigara kullanmamıştı. Venöz yoldan alınan kanlar hemen santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve çalışmanın yapılacağı zamana kadar - 80° C de saklandılar. Daha sonra MDA düzeyleri, SOD ve GPx aktiviteleri çalışıldı.

İstatistikler SPSS paket programı ile yapıldı (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Sonuçlar Kruskal-Wallis testi ile yorumlandı. P <0.05 ise sonuç anlamlı kabul edildi.

Çalışma gruplarında, hem anne hem de bebeklerin serum MDA düzeyleri (p=0.63) ve SOD (p=0.98) aktiviteleri arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Oysa, anne GPx (p=0.028) ve bebek GPx aktiviteleri (p=0.039) anlamlı derecede farklı idi. Çalışma grupları ikiye ayrılarak GPx aktiviteleri açısından analiz edildiğinde, yalnızca anneleri aktif olarak sigara kullanan bebekler ile anneleri sigara kullanmayan bebekler arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı (p=0.015).

Artmış GPx aktivitesi nedeni ile, sigara içen grubun daha çok oksidatif strese maruz kaldıkları düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Sigara, gebelik, oksidatif stres, antioksidanlar

The influence of smoking on maternal and neonatal oxidant/antioxidant status in pregnancy.

Oxidative stress has been reported to play a role in some physiological and pathological conditions, including pregnancy and its complications. Although there are many studies revealing that antioxidant status are impaired in adult smokers, there is only few studies investigating the influence of smoking on pregnant women's and their newborns' oxidant/antioxidant status.

The aim of this study was to evaluate the levels of serum malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities in mothers and their infants in relation to maternal smoking.

Forty-one mothers and their infants (7 days old) were enrolled in the study. Based on interview and birth records, 41 mothers and their infants were meeting eligibility criteria and classified into one of three groups: the active-smoking group (n=12), both the mother (5-10 cigarettes/d) and father (20 cigarettes/d) have been smoking up to date; the passive-smoking group (n=14), the father (20 cigarettes/d) has been only smoking in the house; the non-smoking group (n=15), the parents have never smoked either before or during pregnancy. Serum aliquots were immediately stored at -80 °C until biochemical analyses were performed. Thereafter MDA levels, SOD and GPx activities were studied.

All data were entered into an SPSS database. Results were analyzed using Kruskal-Wallis One-Way analysis. A p value <0.05 was considered statistically significant.

No significant differences were noted among the study groups with respect to MDA levels (p=0.63) and SOD activities (p=0.98) in both mothers and their infants. However, there were significant differences among the study groups with respect to serum GPx activities in both mothers (p=0.028) and their infants (p=0.039). When GPx activities were analyzed separately in both mothers and infants, a significant difference was only noted between the infants of smoking and infants of non-smoking groups (p=0.015).

Increased GPx activity suggested that the smoking group have been exposed to more oxidant stress.

Key words: smoking, pregnancy, oxidative stress, antioxidants

KISALTMALAR

- MDA**, Malondialdehid
SOD, Superoksid Dismutaz
GPx, Glutasyon Peroksidaz
GSH: Redükte glutasyon
H₂O₂: Hidrojen peroksit
NO[•]: Nitrik oksit
O₂^{•-} : Superoksit radikali
OH[•]: Hidroksil radikali
¹O₂: Singlet oksijen
XO: Ksantin oksidaz
PUFA: Poliansatüre yağ asidi
SOR: Serbest oksijen radikalleri

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sigaranın kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, kanser, ülser ve osteoporoz gibi bir çok kronik hastalıkta önemli bir risk faktörü olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir (1). Yılda ortalama olarak her beş ölümün birinden sigara sorumludur (2). Sigaranın bu zararlı etkilerine rağmen, 15 yaş ve üstü insanların yaklaşık olarak üçte biri düzenli olarak sigara kullanmaya devam etmekte ve bu insanların yarısı orta yaşlarda sigaraya bağlı olarak ölmekte, diğer yarısında ise yaşam kalitesi önemli ölçüde azalmaktadır (3). Doğurganlık çağındaki kadınlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, sigaranın doza bağımlı olarak konsepsiyonu 2 ay geciktirdiği ve menapoz başlama yaşını ise 2 yıl erkene aldığı gösterilmiştir (4,5).

Sigara kullanan gebelerin çocukları erken doğmakta; düşük doğum ağırlığı, perinatal ölüm ve ani bebek ölümleri bu bebeklerde daha fazla görülmektedir (1,6,7,8). Diğer yandan, sigara kullanan kadınların çocuklarında ileri yaşlarda davranış bozuklukları daha sık görülmekte ve bu çocukların zihinsel düzeyleri ve okul performansları olumsuz yönde etkilenmektedir (9, 10). Erken doğum, intrauterin gelişme geriliği ve perinatal mortalite gibi, gebeliğin istenmeyen komplikasyonlarını önlemede sigara bağımlılığından kurtulmanın en etkin çözüm olduğu bildirilmektedir (11,12). Oksidatif stres hipertansiyon, diyabet, kanser, romatizma ve ateroskleroz gibi bir çok hastalığın etiolojisinde önemli rol oynamaktadır. Gebelik komplikasyonlarında da oksidatif stresin önemi gösterilmiştir (13,14,15). Normal gebelikte oksidatif stres artmıştır; bununla beraber antioksidan vücut savunmalarında da artış vardır (13,15).

Sigara, bir çok hastalığın etiolojisinden sorumlu tutulmasına rağmen, hangi mekanizmaların bu zararlı etkilere neden olduğu çok iyi bilinmemektedir. Sigara, içerdiği toksik maddeler nedeni ile tam bir oksidatif stres kaynağıdır. Oluşan serbest radikaller hücrelerdeki protein, lipit ve DNA yapılarını bozarak hücre harabiyetine neden olmaktadır. Aynı zamanda vücudun antioksidan mekanizmalarını bozarak hücre hasarını daha da arttırmaktadırlar.

Sigara kullanan erişkinlerde antioksidan savunma sistemlerinin bozulduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır (16,17,18,19). Oysa, sigaranın gebe kadınlar ve yenidoğan bebekleri üzerine olan oksidatif etkilerini araştıran çalışma sayısı azdır (20,21). Bu çalışma ile aktif sigara kullanan, pasif olarak sigaraya maruz kalan ve sigara kullanmayan annelerin ve bunların sigaradan ciddi manada etkilenmemiş yenidoğan bebeklerinin serum malondialdehid (MDA) düzeylerini, superoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerini araştırdık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. SERBEST RADİKALLER

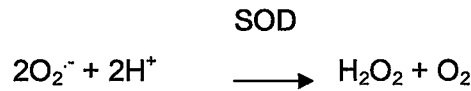
Sigara lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve diğer biyomoleküllerde hasara neden olabilen bir çok serbest radikaller içerir (22). Her sigara dumanında yaklaşık olarak 10^{15} serbest radikal vardır (23).

Normal koşullarda, hücre metabolizması sırasında % 1-2 oranında serbest radikal oluşur. Ultraviyole ışık, radyasyon, infeksiyon, inflamasyon, ilaçlar, sigara ve daha bir çok etkene bağlı olarak oluşabilen serbest radikaller, antioksidan savunma sistemi kapasitesini aştığı zaman yada antioksidan savunma sisteminde bir bozulma meydana geldiğinde hücreyi ve organizmayı etkileyen patolojik süreç başlar. Çoğu serbest radikalin yarılanma ömrü çok kısa olmasına rağmen; amino asitler, proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi hücre bileşenleri ile etkileşmesi sonucu hücre fonksiyonları bozulmaktadır. Vücutta dengenin korunabilmesi antioksidan kapasitede sürekli yenilenmeyi gerektirir ve bu koşullar oluşmadığında oksidatif hasar artarak önemli patolojik sonuçlar doğurmaktadır (24,25).

Serbest radikalleri, oksijen merkezli ve oksijen merkezli olmayan serbest radikaller olarak sınıflandırmak mümkündür. Oksijenin iki eşleşmemiş elektron bulundurması, onun serbest radikallerle daha kolay reaksiyona girmesini sağlar. Bu nedenle canlı organizmalarda en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir.

2.1.1. Superoksid Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir. $O_2^{\cdot-}$, serbest radikal olmakla birlikte asıl önemi H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarını indirgemesidir. $O_2^{\cdot-}$, superoksid dismutaz (SOD) enzimi ile H_2O_2 ve O_2 'e dönüştürülerek hızla elimine edilir.



Superoksid radikali, $\cdot OH$ radikalinden daha az reaktiftir ve ortaya çıktığı hücre bölümünden daha uzak yerlere kolaylıkla geçerek başka radikallerin oluşmasına ve doku hasarına neden olur (24).

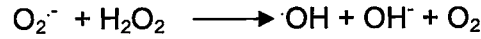
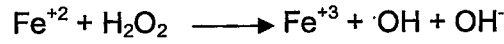
Nitrik oksit (NO) vasküler endotelde, fagositlerde ve beyin dokusunda üretilen "relaxing factor" olarak bilinen, önemli fizyolojik fonksiyonları olan bir serbest radikaldir. Fakat NO'nin fazlası toksik etkiye sahiptir. $O_2^{\cdot-}$, NO ile birleşerek reaktif oksijen türevi peroksinitritler ($ONOO^{\cdot-}$) meydana gelir. Bu durumda NO'nin normal fizyolojik etkisi

inhibe olurken, ONOO⁻ proteinler üzerine zararlı etkiler oluşturur ve azot dioksit (NO₂), ·OH radikali ve nitronyum iyonu (NO₂⁺) gibi başka toksik ürünlere dönüşür (26).

Sigaranın, endotel hücrelerinde oksidatif hasara neden olarak NO üretimini azalttığı ve bu şekilde endotel disfonksiyona neden olduğu bildirilmektedir (27,28).

2.1.2. Hidroksil Radikali (·OH)

Hidroksil radikali, çok kısa ömürlü olmasına rağmen, bütün biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilen yüksek reaktiviteye ve küçük miktarlarda bile aşırı hasar oluşturma özelliğine sahiptir. ·OH, demir iyonu katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile veya demir veya bakır iyonları katalizörlüğünde Haber-Weiss reaksiyonuyla oluşur (29):



·OH, tioller ve yağ asitleri gibi pek çok biyolojik molekülden H⁺ atomlarını kopararak çeşitli yeni radikallerin (sülfür radikalleri, RS[·]) oluşmasına sebep olur. Oluşan sülfür radikalleri, O₂ ile birleşerek RSO[·] ve RSO₂[·] gibi oksisülfür radikallerini oluşturur. Sonuçta hücre membranında peroksidasyona ve protein hasarına neden olur.

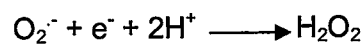
·OH, membran fosfolipidlerindeki poliansatüre yağ asitlerinin yan zinciri ile reaksiyona girerek, zincirdeki C atomundan H⁺'i ayırıp H₂O ile birleştirir ve bu olay membran yapı ve bütünlüğünü bozacak olan tepkimeler zincirini (lipid peroksidasyonunu) başlatır. In vitro çalışmalar, ·OH radikalının doku hasarından primer sorumlu oksijen türevi olduğunu göstermektedir (30,31).

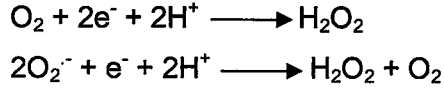
2.1.3. Singlet Oksijen (¹O₂)

Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesi ile oluşur. Singlet oksijen ortaklaşmamış elektron bulundurmadığından serbest radikal değildir, ancak serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olduğu için önemlidir. Singlet oksijenin DNA hasarı oluşturduğu ve mutajenik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (32).

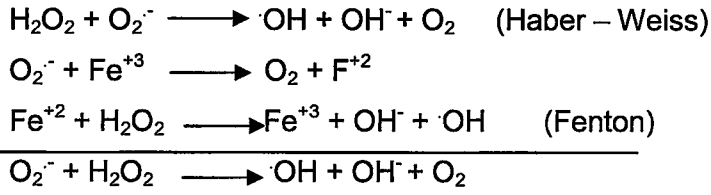
2.1.4. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin iki elektron alması veya O₂⁻'in bir elektron alması sonucu peroksitler oluşur. Peroksit molekülünün iki H⁺ atomu ile birleşmesi sonucu H₂O₂ oluşur. Ancak biyolojik sistemlerde H₂O₂'nin asıl üretimi O₂⁻'in dismutasyonu ile oluşur. O₂⁻'in dismutasyonu ya spontandır yada SOD tarafından katalizlenir.





H_2O_2 serbest radikal değil fakat geçiş metal iyonları varlığında (Haber – Weiss ve Fenton reaksiyonlarıyla) en reaktif ve toksik serbest oksijen radikali olan $\cdot\text{OH}$ 'ın kaynağını oluşturması açısından önemlidir. H_2O_2 uzun ömürlüdür ve biyolojik membranları kolayca geçerek uzak bölgelerde intrasellüler Fenton reaksiyonu ile fosfolipidler, karbonhidratlar, metalloproteinler ve DNA'yı hasara uğratabilirler (24,25).



2.1.5. Diğer Radikaller

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ($\text{R}\cdot$), peroksil radikalleri ($\text{ROO}\cdot$), alkoksil radikalleri ($\text{RO}\cdot$), sülfür radikalleri ($\text{RS}\cdot$) gibi önemli serbest radikaller meydana gelir. Bunlardan özellikle poliansatüre yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir. Sülfür radikalleri oksijenle tekrar reaksiyona girip sülfenil ($\text{RSO}\cdot$) veya sülfür (thiyl) peroksil ($\text{RSO}_2\cdot$) gibi radikalleri meydana getirirler.

2.2. SERBEST RADİKALLERİN ORGANİZMADAKİ ETKİLERİ

Serbest radikaller vücutta, hem endojen hem de eksojen faktörler sonucu oluşabilir. Normal bir biyolojik sistemde oluşan serbest radikaller antioksidan savunma mekanizmaları ile dengede tutulur. Bu dengenin serbest radikaller lehine bozulması durumu "oksidatif stres" olarak ifade edilir. Oksidatif stres durumlarında ya antioksidan savunma sistemleri zayıflamıştır veya serbest radikal üretimi artmıştır, yada her iki etki bir arada görülür. Oksidatif stres durumlarında serbest radikaller lipid, protein, nükleik asit, karbonhidrat ve enzim gibi hücrenin tüm önemli bileşenlerine etki ederler (15).

2.2.1. Membran Lipitlerine Etkileri

Lipidler, serbest radikal hasarından en çok etkilenen hücre bileşenleridir. Membranda bulunan kolesterol ve poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona uğrarlar. Lipid

peroksidasyonu olarak bilinen bu durum kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonları şeklinde ilerler ve bu şekilde oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonu malondialdehid (MDA) oluşur. MDA ölçümü, lipit peroksidasyonunun bir göstergesidir (26,33). Membranda oluşan yaygın lipit peroksidasyonu membran akışkanlığında değişikliğe, membran potansiyelinde azalmaya, membranın H⁺ ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğinde artışa neden olur. Hücre ve hücre içi organellerin (lizozomlar) içeriklerinin dış ortama salınmasına yol açar. Lipid peroksitler ve yıkım ürünü aldehidler, makrofaj aktivitesini baskılar, protein sentezini inhibe eder, enzimleri inaktive eder, membran bileşenlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna neden olur. MDA, kolay diffüze olabildiğinden DNA yapısındaki bazlarla etkileşir.

2.2.2. Proteinlere Etkileri

Proteinler, serbest radikallerin etkilerine PUFA'den daha az duyarlı olup, proteinlerde hasar oluşturan zincir reaksiyonların oluşma olasılığı çok azdır. Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme derecesi amino asit içeriklerine, duyarlı amino asitlerin protein yapısındaki kompozisyonuna ve oluşan hasarın onarılabiliğine bağlıdır. Sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler. Sonuçta sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller oluşur. Bu reaksiyonlar sonucu IgG ve albumin gibi çok sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (34).

2.2.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri:

Serbest radikaller, DNA'da tek veya çift bağ kırıklarına yol açarak hücrede mutasyona ve hücre ölümüne neden olurlar. DNA'da hasarın oluşması için serbest radikallerin spesifik bölgelere yüksek konsantrasyonda bağlanarak, zincir kırılmalarına yol açmaları veya replikasyon olmadan önce DNA tamir sistemlerini etkisiz hale getirerek mutasyonlara yol açmaları gerekir (33). İn vitro şartlarda DNA'da oluşturulan hasarın çoğu diffüzyonla geçen ·OH radikaline bağlıdır. ·OH radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek DNA'da değişikliklere yol açar. DNA zincirindeki kırılmaların daha çok radikallerin şeker-fosfat çatısı ile reaksiyonu neticesi veya DNA'nın δ ışını, O₂⁻, H₂O₂ ve enzim kaynaklı oksijen radikallerine maruz kalması

sonucudur (33). O_2^- e maruz bırakılan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir. Çünkü, otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozus (SLE) ve romatoid artrit (RA) dolaşımında anti-DNA antikoları bulunur.

2.2.4. Karbonhidratlara Etkileri:

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , peroksidler ve okzoaldehidler meydana gelir. Bunların diyabet, kanser ve sigara içimi ile birlikte olan kronik hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir. Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanırlar ve aralarında çapraz bağlar oluşturarak kanser gelişimi ve yaşlanma sürecinde rol oynarlar.

2.2.5. Hücre dışı etkileri:

Hyalüronik asit, sinoviyal sıvıda bol miktarda bulunan önemli bir mukopolisakkarittir. İnflamatuar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvıya bolca geçen polimorfonüveli lökositler, immün komplekslerle aktivasyonları sonucu sinoviyal sıvıya çok miktarda O_2^- ve H_2O_2 salgırlar. Bu reaktif oksijen türlerinin in vitro hyalüronik asidi parçaladıkları gösterilmiştir. Hyalüronik asidin parçalanması inflamatuvar eklem hastalıklarında sinovial sıvının karakteristik bir özelliğidir (26). Kıkırdak dokusunun esas ögesi olan kollajen O_2^- ile hasarlanır ve jelasyon önlenir. Ekstrasellüler sıvının çok düşük seviyede SOD ve katalaz aktivitesine sahip olması nedeni ile reaktif oksijen türlerinin düşük miktarları bu kompartmanlarda yaygın hasara sebep olabilirler (33). Gözün vitreus humor'unda bol miktarda hyalüronik asit bulunur. Bunun oksidatif hasarı da katarakt oluşumuna yol açar (26).

2.3. SERBEST RADİKALLERİN YARARLI ETKİLERİ

Serbest radikaller, canlı organizmada gerçekleşen bir çok fizyolojik süreçte görev alırlar. Örneğin, oksijen radikalleri hücrede gerçekleşen sinyal iletimi, gen transkripsiyonu ve guanilat siklaz aktivitesinin düzenlenmesi gibi çeşitli olaylarda kritik rol oynarlar (35,36). Keza nitrik oksit en çok bilinen sinyal ileten moleküllerden biridir ve vücutta hemen hemen her hücre ve organ fonksiyonunda görev alır. Endotel hücreleri tarafından üretilen NO' in fizyolojik düzeyleri vasküler tonus, trombozis, angiogenesis, trombosit agregasyonu, lökosit adezyonu, vasküler düz kas hücrelerinin çoğalması ve gevşeme fonksiyonlarının düzenlenmesi için gereklidir (36). İlave olarak, nöronlar tarafından üretilen NO, nörotransmitter olarak fonksiyon görürken, aktive olmuş

makrofajların oluşturduğu NO, immun cevabın oluşmasında önemli bir mediatördür (37). Bununla birlikte serbest radikaller, demir-sülfür merkezli enzimlerin inhibitörleri ve okside edici ajanlar gibi davranarak biyomoleküllerin (protein, amino asit, lipid, DNA vs.) oksidasyonuna ve dolayısıyla da hücre hasarı ve ölümüne neden olurlar. Serbest radikallerin sitotoksik etkileri memeli hücreleri için zararlıdır ve ateroskleroz, diyabet, romatoid artrit, parkinson, katarakt ve yaşlanma gibi bir çok süreçte karşımıza çıkar. Bu nedenle, fizyolojik düzeylerde sinyal iletilici ve regülatuar moleküller olarak görev alırlarken, patolojik düzeylerde oldukça sitotoksik ve zararlı oksidanlar olarak fonksiyon görürler.

2.4. ANTİOKSİDAN MEKANİZMALAR

Serbest radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği zararlı etkileri sınırlandırmak için canlı organizmalarda çeşitli antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Antioksidan etki tipleri (1) toplayıcı (scavenging) (2) baskılayıcı (guencher) (3) zincir kırıcı (chain breaking) (4) onarıcı (repairing) olmak üzere 4 şekilde olabilir. Oluşmuş serbest radikalleri tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine "toplayıcı etki", serbest radikallerle etkileşip onlara bir H⁺ atomu aktararak etkilerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme işlemine "baskılayıcı", radikalleri kendilerine bağlayarak reaksiyon zincirini kıran etkiye "zincir kırıcı etki" ve diğer bir antioksidan savunma sistemi olan tamir işlemine de "onarıcı etki" denir (37).

Antioksidanlar, endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı olanlar şeklinde sınıflandırılabilir gibi enzim olan ve enzim olmayan antioksidanlar olarak da sınıflandırılabilir.

2.4.1. ENZİM OLAN ANTİOKSİDANLAR

2.4.1.a. Superoksid dismutaz (SOD)

Sitoplazmada bulunan ve bakır-çinko ihtiva eden superoksid dismutaza CuZnSOD; mitokondride bulunan ve manganez ihtiva edene ise MnSOD denir. Enzim, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korur. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. (29).

Sigara içen erişkinlerde SOD aktivitesi düşük bulunmuştur. Oksidatif strese karşı SOD kullanımı sonucu enzimin aktivitesi düşmektedir (38).

2.4.1.b. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

GPx, H₂O₂, steroid ve lipit hidroperoksidler üzerine etkili bir antioksidan enzimdir. GPx, tetramerik 4 selenyum atomu ihtiva eder ve ciddi selenyum eksikliği durumlarında GPx aktivitesi düşebilir. GPx, sitozol ve mitokondrial yerleşimli bir enzimdir. Eritrositlerde mitokondri olmadığı halde oksidatif strese karşı en etkili antioksidan enzim GPx dir.

GPx, H₂O₂ ve diğer hidroperoksidleri indirgemesi, glutatyonun okside formunun indirgenmesinden sorumlu olan glutatyon redüktaz aktivitesine ve bu reaksiyon için gerekli olan NADPH mevcudiyetine bağlıdır. GPx, düşük H₂O₂ konsantrasyonlarında etkili olup, lipit hidroperoksidlerini uzaklaştırmada katalazdan daha önemli bir rol oynamaktadır ve oksijen toksisitesine karşı katalazdan daha fazla koruyucudur (33,39). Sigara içen erişkinlerde enzim aktivitesinin düştüğünü (16,17), değişmediğini (40,41) ve arttığını bildiren çalışmalar vardır (18,19).

Tablo 1. Endojen antioksidanlar

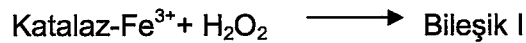
Enzim olan Antioksidanlar	Etki mekanizması
<ul style="list-style-type: none"> • Superoksid dismutaz • Glutatyon peroksidaz • Glutatyon-S - transferaz • Katalaz • Sitokrom oksidaz 	<ul style="list-style-type: none"> Superoksid anyonlarının detoksifikasyonu Hidrojen peroksid detoksifikasyonu Hidroperoksidlerin detoksifikasyonu Hidrojen peroksid detoksifikasyonu Moleküler O₂ nin detoksifikasyonu
Enzim Olmayan Antioksidanlar	
<ul style="list-style-type: none"> ◆ Lipit fazda bulunanlar • α - Tokoferol • β - Karoten 	<ul style="list-style-type: none"> O₂⁻ ve ·OH toplayıcı etki O₂⁻ ve ·OH toplayıcı etki
<ul style="list-style-type: none"> ◆ Sıvı fazda bulunanlar • Vitamin C (askorbik asit) • Albumin • Bilirubin • Sistein • Serüloplazmin • Transferin ve Laktoferrin • Ferritin • Glutatyon • Melatonin 	<ul style="list-style-type: none"> LOOH ve HOCl toplayıcı etki LOOH ve HOCl toplayıcı etki O₂⁻ ve ·OH toplayıcı etki SOD benzeri aktivite Fe⁺² yi Fe⁺³ e yükseltgeyerek Dolaşımdaki serbest demirin bağlanması Doku demirinin bağlanması GPx için substrat, O₂⁻ ve ·OH toplayıcı etki SOD ve GPx aktivitesini artırarak

Tablo 2. Eksojen antioksidanlar

XO inhibitörleri	Etki mekanizması
• Allopurinol	
• Folik asit	süperoksid üretiminin inh.(XO ile)
NADPH oksidaz inhibitörleri	
• Adenozin	
• Lokal anestezikler	Nötrofillerde NADPH ile süperoksid
• Kalsiyum kanal blokerleri	üretiminin inhibisyonu
• Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar	
Superoksid dismutaz	
• Nativ SOD	
• IgA'ya bağlı SOD	
• Polietilen glikol SOD	reaksiyonun katalizlenmesi
Katalaz	
• Nativ katalaz	$2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
• Polietilen glikol katalaz	reaksiyonun katalizlenmesi
• Lipozom kapsüllü katalaz	
Demir Redoks Döngüsü İnhibitörleri	
• Desferroksamin	Serbest demir bağlama
• Seruloplazmin	SOD'a benzer mekanizma ile etki
GPx aktivitesini artıranlar	
• Glutasyon	GPx aktivitesini artırarak
• Melatonin	O_2^- ve OH toplayıcı etki

2.4.1.c. Katalaz (KAT)

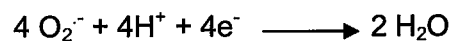
Tanımlanan ilk antioksidan enzim olan katalaz, iki basamakta hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (39):



Katalaz, aktivitesi için Fe^{3+} e ihtiyaç duyar. H_2O_2 oluşturan enzimlerin çoğunun peroksizomlarda bulunmasından dolayı, katalaz en fazla peroksizomlarda lokalizedir. Katalazın indirgeyici aktivitesi, H_2O_2 , metil, etil hidroperoksidleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Katalaz büyük moleküllü lipit hidroperoksidlerine etki etmemektedir. Literatürde sigara ve katalaz ilişkisini inceleyen çalışma bulunamamıştır.

2.4.1.d. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, süperoksid radikallerini detoksifiye eder:



Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Ancak, superoksit üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek superoksidi detoksifiye eder (26).

2.4.2. ENZİM OLMAYAN ANTIOKSIDANLAR

2.4.2.a. Vitamin E

Vitamin E dokularda en önemli zincir kırıcı antioksidandır. Serbest radikalleri tutarak, hücre membranlarını serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. E vitamini, biyolojik membranlarda fosfolipit molekülleri içinde bulunur ve bir molekül α - tokoferol 100 molekül PUFA'nın peroksidasyonunu engelleyebilir. Vitamin E zincir kırıcı etkisini lipid peroksi radikallerini ($LOO\cdot$), lipid hidroperoksidlerine ($LOOH$) indirgeyerek ve lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırarak gerçekleştirmektedir. E vitamini, daha çok peroksid radikali ile olmak üzere, singlet oksijen ve süperoksit radikali ile reaksiyona girer ve onları detoksifiye eder (34).

E vitamini ile sigara kullanımı arasındaki ilişki tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar sigara bağımlılarında düşük plazma vitamin E konsantrasyonu saptamalarına rağmen (42), diğer bazı araştırmacılar ise bir fark tespit edememişlerdir (43,44).

2.4.2.b. Vitamin C (Askorbik Asit)

C vitamini, güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. $O_2\cdot^-$ ve $\cdot OH$ radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Sigara bağımlılarının serumlarındaki askorbik asit, sigara kullanmayanlara göre daha düşük konsantrasyonlarda bulunmuştur (45,46). Bunun nedeni askorbik asidin absorpsiyonunun bozulması ya da askorbik asit turnoverinin artmasıdır (27). İlginç olarak sigara kullananların diyet ile aldıkları askorbik asidin de düşük olduğu bildirilmektedir (47).

2.4.2.c. β - Karoten

Vitamin A'nın metabolik ön maddesi olup, yağda çözünen bir antioksidandır. β - karotenin singlet oksijeni baskıladığı ve $O_2\cdot^-$ radikallerini temizlediği belirtilmiştir (33). Sigara kullanımı ile β -karoten konsantrasyonu arasında negatif ve istatistiksel olarak anlamlı farklar literatürde bildirilmektedir (43,48).

2.4.2.d. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), serotoninden sentezlenen bir hormondur. Melatonin, $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$, HOCl , H_2O_2 , peroksi radikalleri, nitrik oksit ve peroksinitrit anyonlarının toksisitelerini direk yada indirek etkilerle azaltır. Melatonin, en zararlı radikal olan $\cdot\text{OH}$ radikalleri ile reaksiyona girdikten sonra bir indol katyon radikaline dönüşür ki bu da ortamdaki $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterir. Ayrıca melatonin, SOD, GP_x aktivitelerini ve intrasellüler GSH seviyesini artırırken, pro-oksidan enzim olan nitrik oksid sentetazı inhibe eder (49,50).

2.4.2.e. Glutasyon (GSH, γ -glutamilsisteinilglisin)

GSH, moleküllerdeki – SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. Redükte glutasyon (GSH), GP_x aktivitesi ile okside glutatona (GSSG) dönüşürken, aynı reaksiyonda hidrojen peroksid H_2O_2 'ya dönüşür. GSSG, NADPH'in kullanıldığı glutasyon redüktaz reaksiyonu ile tekrar GSH'a dönüşür (34).

GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek, eritrosit, lökosit ve göz lensi hücrelerini oksidatif strese karşı korur. Eritrosit membranını H_2O_2 'den, lökositleri fagositozda kullanılan oksidan maddelerden ve lens proteinlerini oksidatif hasardan korur.

2.4.2.f. Selenyum (Se)

Selenyumun, E vitamini gibi membran lipitleini oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi vardır. Se, GP_x 'in aktif bölgesinin bir komponentidir. Ciddi selenyum eksikliği durumlarında GP_x eksikliği ortaya çıkabilir. Selenyum ile sigara arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma sayısı azdır. Bazı çalışmalarda sigara bağımlılarında serum selenyum seviyeleri düşük bulunmuştur. Bu sigaranın etkisinden ziyade diyet ile alınan selenyumun düşüklüğüne bağlanmıştır (51,52). Bir çalışmada ise herhangi bir ilişki saptanmamıştır (53).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma grupları

1 Mayıs 2003-30 Ekim 2003 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesinde doğum yapmış 41 anne (yaş aralığı: 20-35) ve 7 günlük bebekleri çalışmaya alındı. Çalışma Atatürk Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylandı. Bu dönemde mümkün olduğu kadar çok sigara içen anne bulunmaya çalışıldı. Sigara içmeyen ve pasif olarak sigaraya maruz kalan anneler ise polikliniğimize başvuran anneler arasından ardışık olarak seçildi. Doğum sonrası bebeklerini rutin kontrole getiren annelerle karşılıklı görüşülerek sigara öyküsü sorgulandı. Eğer anne sigara kullanıyorsa, günde kaç tane içtiği ve kaç yıl süreyle sigara kullandığı kaydedildi. Gebelik ve doğum ile ilgili detaylı bilgiler ise doğum kayıtlarından elde edildi. Doğum kayıtları ve annelerle karşılıklı görüşmeler sonucu 41 anne ve bebeği çalışmaya dahil edildi; aktif sigara içiciler (n=12), anne (5-10 sigara/gün) ve baba (20 sigara/gün) sigara içiyor idi; pasif sigara içiciler (n=14), yalnız baba sigara kullanıyor idi (20 sigara/gün); sigara içmeyen grup (n=15), ne gebelikte ne de gebelikten önce evde hiç kimse sigara kullanmamıştı. Doğum sonrası genelde anneler sigarayı bırakmakla beraber, bu dönem için ayrıntılı sorgulama yapılmadı. Çalışmada annelerin bir işte çalışmaları da gözönüne alınmamıştır. Annelerin asıl sigara durumunun göstergesi olan idrar kotinin değerlerine de bakamadık. Çalışmamızda kord kanı değerlerinin de olması çalışmamızı daha anlamlı yapacaktı. Ancak kord kanı değerlerini alamadık. Diğer yandan literatürde GPx aktivitesinin uzun bir dönemi takiben olduğu bildirilmekle beraber, kesin bir süre verilmemektedir. GPx aktivitesi oksidatif stresi değil, oksidatif strese maruz kalındığının bir göstergesidir. Bu çalışma ile postnatal 7.gündeki enzim aktiviteleri çalışılarak bu dönemdeki durumun değerlendirilmesi amaçlandı.

3.2. Çalışmaya alınmama kriterleri

- Annede kronik hastalık
- Annede alkol kullanımı
- Gebelikte hipertansiyon, pre-eklampsi, diyabet ve infeksiyon
- Bebeğe doğum komplikasyonları (asfiksi, mekonyum aspirasyonu gibi)
- Neonatal infeksiyon
- Konjenital anomalili bebekler
- Fototerapi ve/veya kan değişimi gerektiren sarılık
- Mama ile beslenen bebekler

- Doğum ağırlığı <2500 gr
- Gebelik haftası < 37 hf
- Sezeryan doğum

3.3. Biyokimyasal testler

Venöz yoldan alınan kanlar hemen santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve çalışmanın yapılacağı zamana kadar - 80° C de saklandılar.

3.3.1. Malondialdehid (MDA) tayini

Prensip: 95 C de inkübasyon sonucu, tiyobarbutirik asit (TBA) ile MDA'nın oluşturduğu pembe renkli kompleksin absorbandsının 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (54).

Kullanılan Reaktifler:

- ⊕ Fosfat Tamponu (PH:7.4): 8.1 gr/L NaCl, 2.302 gr/L Na₂HPO₄, 0.194 NaH₂PO₄
- ⊕ Butylated hydroxytoluene (BHT) çözeltisi, % 0.88
- ⊕ TCA çözeltisi, % 30
- ⊕ EDTA, 0.1 M
- ⊕ Tiobarbutirik asit (TBA) çözeltisi, % 1
- ⊕ NaOH, 0.05 N

Deneyin Yapılışı:

-80 C den alınan numuneler önce -20 C, daha sonra 4 C de bir müddet bekletilerek iyice çözünmeleri sağlandı. Serum numuneleri 3500 x g de, 10 dakika (4 C de) santrifüj edildi. Aşağıda verilen deney şemasına göre (Tablo 3), Jain ve arkadaşlarının tariflediği metotla MDA tayini yapıldı (54).

Tablo 3. Serum da MDA ölçümü

	Numune Tüpü	Kör Tüpü
Fosfat tamponu	0.8 ml	0.8 ml
Numune	0.2 ml	—
BHT çözeltisi	0.025 ml	0.025 ml
TCA çözeltisi	0.5 ml	0.5 ml
Vorteksle karıştırıldı, 4 C'de 2 saat inkübasyon sonrası 2000 g de 15 dk santrifüj edildi ve kapaklı tüplere:		
Süpernatant	1 ml	1 ml
EDTA çözeltisi	0.075 ml	0.075 ml
TBA çözeltisi	0.25 ml	0.25 ml
95 C'de 15 dk inkübe edildi		

İnkübasyon sonrası tüpler musluk suyu ile soğutuldu. Absorbanslar 532 nm dalga boyunda köre karşı okutularak sonuçlar hesaplandı.

Hesaplamalar:

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{Absorbans} \times 10^6}{1.52 \times 10^5} \times \text{DF}$$

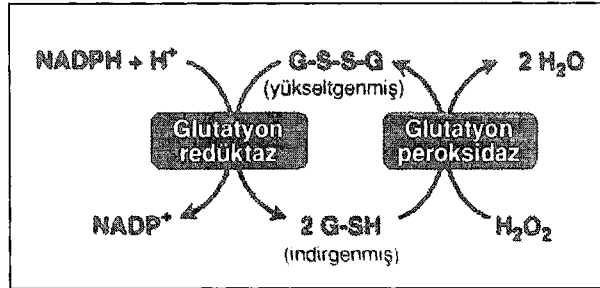
$1.52 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$: Molar absorbtivite katsayısı

DF: Dilüsyon faktörü

10^6 : Molü, mikromole çevirme katsayısı

3.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Tayini

Prensip: GPx, H_2O_2 varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalizler. Bu reaksiyon ile oluşan GSSG, NADPH'ın indirgeyici substrat olarak kullanıldığı glutasyon redüktaz (GR) reaksiyonuyla tekrar GSH'a dönüşür. Bu reaksiyonlar esnasında NADPH'ın NADP' ye yükseltgenmesi ile oluşan absorbans azalışı 340 nm de spektrofotometrik olarak ölçülerek GPx aktivitesi hesaplanır (55).



Kullanılan Reaktifler:

Fosfat tamponu: 50 mM, pH 7.5, mM EDTA'lı

GSH: 150 mM

Glutasyon redüktaz

NADPH: 8.4 mM

NaN_3 : 1.125 M

H_2O_2 : 2.2 mM

Drabkin çözeltisi: 1.2 mM $K_3Fe(CN)_6$, 1.6 mM KCN ve 23.8 mM $NaHCO_3$ içerir.

Deneyin Yapılışı:

GPx aktivitesi, Paglia ve Valentine'nin tariflediği metoda göre ölçüldü (55). -80 C den alınan numuneler önce -20 C, daha sonra 4 C bir müddet bekletilerek iyice çözünmeleri sağlandı. Serum numuneleri 3500 x g de, 10 dakika (4 C de) santrifüj edildi. NADPH'in nonenzimatik dönüşümünü engelleyerek daha doğru bir ölçüm yapabilmek amacıyla ortamdaki tüm hemoglobinleri siyanomethemoglobine çevirmek için süpernatantın bir kısmı eşit miktarda Drabkin çözeltisi ile karıştırıldı ve bu karışım numune olarak kullanıldı (Tablo 4) (55).

Tablo 4. GPx ölçüm prosedürü

	Deney Tüpü
Fosfat tamponu	2.650 mL
GSH	0.100 mL
NADPH	0.100 mL
NaN_3	0.010 mL
Glutasyon redüktaz	0.010 mL
Numune	0.020 mL
Karıştırıldı ve 37 C de 30 dakika su banyosunda inkübe edildi	
H_2O_2	0.100 mL

Spektrofotometre, 37 C de 340 nm dalga boyunda, 3 dakikalık kinetik okutma programına ayarlandı. İnkübasyon sonrası her tüpe 0.100 mL H_2O_2 ilave edilerek reaksiyon başlatıldı ve 3 dakika süreyle numunelerdeki absorban azalışı kaydedildi.

Hesaplamalar:

$$\text{Enzim aktivitesi (U/L)} = \frac{A/t \times 10^6}{\epsilon} \times DF$$

A/t : Dakikadaki absorban değişimi

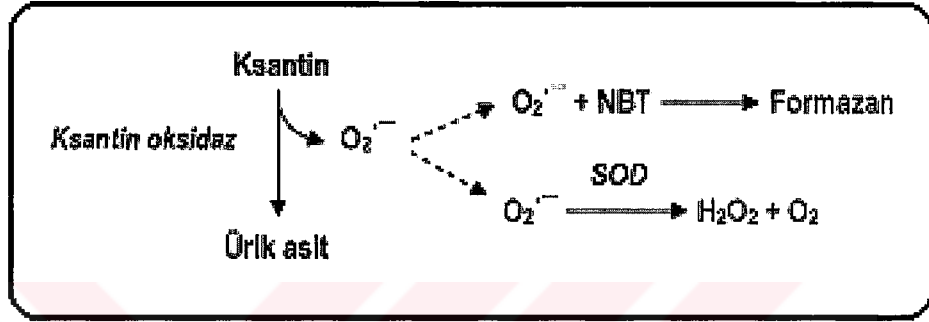
ϵ : NADPH'in 340 nm deki molar absorbtivite katsayısı ($6.22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)

DF: Total reaksiyon hacmi (mL) / Numune hacmi (mL)

10^6 : Molü, mikromole çevirme katsayısı (aktiviteyi ünite cinsinden ifade edebilmek için)

3.3.3. Superoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini

Prencip: Enzimatik reaksiyonla üretilen $O_2^{\cdot -}$ radikallerinin reaksiyon ortamında bulunan NBT'yi indirgemesinin numunede bulunan SOD enzimi tarafından engellenmesi prensibine dayanır. NBT'nin indirgenmesi ile 560 nm dalga boyunda maksimum absorbanans veren mor renkli formazan oluşur. SOD aktivitesinin büyüklüğü oluşan formazanın absorbanansı ile ters orantılıdır (56).



Şekil: Formazan oluşumu ve SOD ile inhibisyon

Kullanılan Reaktifler:

⊕ Assay Reaktifi

Ksantin, 0.3 mM

EDTA, 0.6 mM

NBT, 150 μ M

Na_2CO_3 , 0.4 M

BSA, 1 gr/L

⊕ Ksantin oksidaz, 167 U/L

⊕ $(NH_4)_2SO_4$, 2 M

Deneyin Yapılışı:

-80 C den alınan numuneler önce -20 C, daha sonra 4 C bir müddet bekletilerek iyice çözünmeleri sağlandı. Serum numuneleri 3500 x g de 10 dakika (4 C de) santrifüj edildi. Daha sonra aşağıda verilen deney şemasına (Tablo 5) göre, Sun ve arkadaşlarının metoduyla SOD aktivitesi tayin edildi (56).

Deney tüpleri birer dakika aralıklarla inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda oluşan renkli bileşiğin (formazan) absorbanansı 560 nm dalga boyunda okutuldu.

Hesaplamalar:

İnkübasyon esnasında NBT'nin redüksiyon hızındaki % 50'lik inhibisyon 1 SOD ünitesi olarak ifade edildi. Numunede bulunan SOD enziminin meydana getirdiği % inhibisyon ve enzim aktiviteleri aşağıda verilen formüllere göre hesaplandı:

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Absorbans}_{(Kör)} - \text{Absorbans}_{(Numune)}}{\text{Absorbans}_{(Kör)}} \times 100$$

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\% \text{ inhibisyon}}{50 \times \text{Numune hacmi (mL)}}$$

Tablo 5. SOD ölçüm prosedürü

	Numune Tüpü	Kör Tüpü
Assay reaktifi	2.45 mL	2.45 mL
Numune	0.100 mL	—
Bidistile su	—	0.100 mL
Ksantin oksidaz	0.050 mL	0.050 mL
Karıştırıldı ve 25 C de 20 dakika su banyosunda inkübe edildi		

3.4. İstatistiksel Testler

Tüm istatistiksel testlerde SPSS paket programı yapıldı (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Grupların dağılımı homojen olmakla beraber, gruplardaki vaka sayıları az olduğu için non-parametrik testler kullanıldı. Sonuçlar Kruskal-Wallis One-Way testi ile analiz edildi. P değeri <0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Çoklu karşılaştırmalar ise Mann-Whitney U test ile yapıldı ve p değeri <0.016 (0.05/3) ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan anne ve bebeklerinin demografik özellikleri tablo 6 da gösterilmiştir. Gruplar arasında yaş, ağırlık, çocuk sayısı, eğitim, doğum ağırlığı ve gebelik haftaları açısından anlamlı fark yoktu.

Tablo 6. Çalışmaya Katılan Anne ve Bebeklerinin Demografik Özellikleri.

	Aktif sigara içiciler (n=12)	Pasif sigara içiciler (n=14)	Sigara içmeyen grup (n=15)	P değeri
Anne yaşı (SD), yıl	26.2 (3.5)	25.8 (4.5)	25.7 (3.4)	0.87
Anne tartısı (SD), kg	66.5 (3.2)	66.7 (3.8)	66 (3.0)	0.93
Anne eğitimi (>11 y, %)	2 (16)	2 (14)	3 (20)	0.91
İlk çocuğu olan anne sayısı (%)	7 (58)	7 (50)	8 (53)	0.91
Doğum ağırlığı (SD), gram	3165 (335)	3155 (410.5)	3275 (414.4)	0.66
Gebelik haftası (SD)	39.5 (0.9)	39.4 (1.3)	39.9 (0.7)	0.44

SD: standart deviasyon

Tablo 7. Annelerde Ortalama Serum MDA Düzeyleri, SOD ve GPx Aktiviteleri

	Aktif sigara içiciler	Pasif sigara içiciler	Sigara içmeyen grup	P değeri
MDA ($\mu\text{mol/L}$) (SD)	4.09 (1.59)	3.94 (1.92)	3.48 (1.60)	0.63
SOD (U/mL) (SD)	3.31(1.03)	3.22 (0.98)	3.33 (0.92)	0.98
GPx (U/L) (SD)	128.3 (13.4)	116.0 (8.7)	115.4 (9.7)	0.028

Tablo 7 de ise çalışmaya alınan annelerin ortalama MDA düzeyleri, SOD ve GPx aktiviteleri gösterilmektedir. Sigara içen annelerde ortalama serum MDA düzeyleri biraz daha yüksek olmakla beraber, her üç grup arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ($p=0.63$). SOD aktiviteleri açısından da çalışma grupları arasında

istatistiksel anlamlı fark yoktu ($p=0.98$). GPx aktiviteleri açısından ise gruplar arasında anlamlı fark var idi ($p=0.028$). Annelerin GPx aktiviteleri Mann-Whitney U testi ile ikişerli olarak analiz edildiğinde ise, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı [Aktif sigara içiciler ile pasif sigara içiciler ($p=0.023$), Aktif sigara içiciler ile sigara içmeyen grup ($p=0.019$), pasif sigara içiciler ile sigara içmeyen grup ($p=0.85$)].

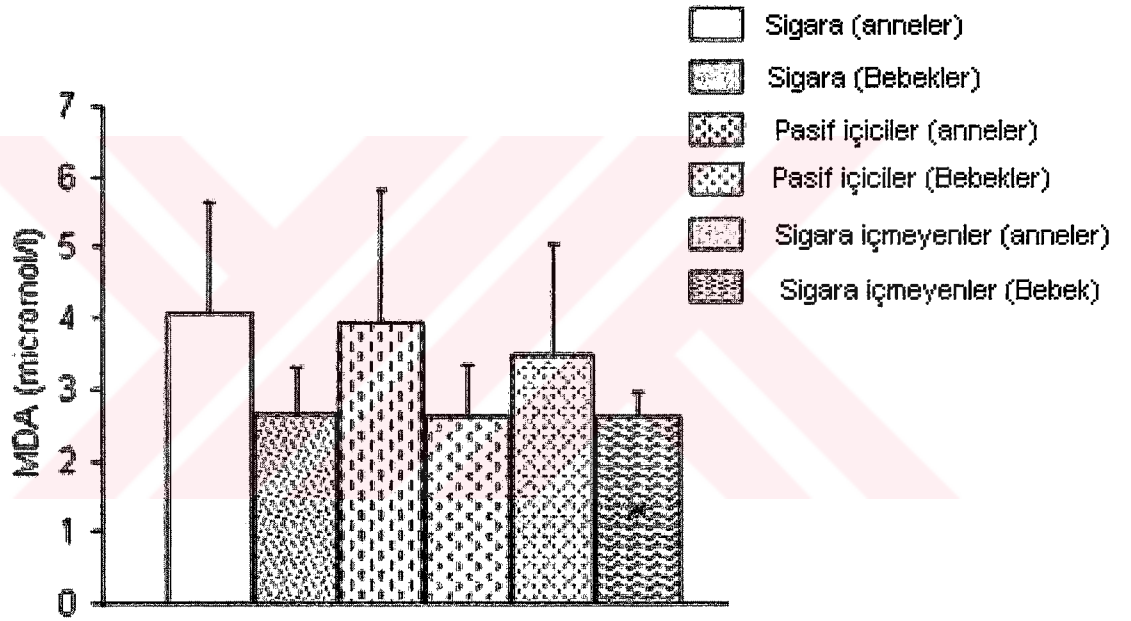
Tablo 8 de çalışmaya alınan bebeklerin ortalama serum MDA düzeyleri, SOD ve GPx aktiviteleri gösterilmektedir. Çalışmaya alınan bebeklerin MDA seviyeleri açısından anlamlı fark yoktu ($p=0.96$). Aktif sigara içicilerde ortalama serum SOD aktiviteleri biraz daha düşük olmakla beraber, gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.73$). GPx aktiviteleri ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı idi ($p=0.039$).

Tablo 8. Bebeklerde Ortalama Serum MDA düzeyleri, SOD ve GPx Aktiviteleri

	Aktif sigara içiciler	Pasif sigara içiciler	Sigara içmeyen grup	P değeri
MDA ($\mu\text{mol/L}$) (SD)	2.66 (0.65)	2.62 (0.72)	2.61 (0.36)	0.96
SOD (U/mL)	5.1 (1.3)	5.6 (1.5)	5.6 (1.4)	0.73
GPx (U/L)	446.4 (60.4) ^a	390.2 (52.2)	377.5 (45.0)	0.039

^a Sigara içen grup ile sigara içmeyen grup ($p=0.015$)

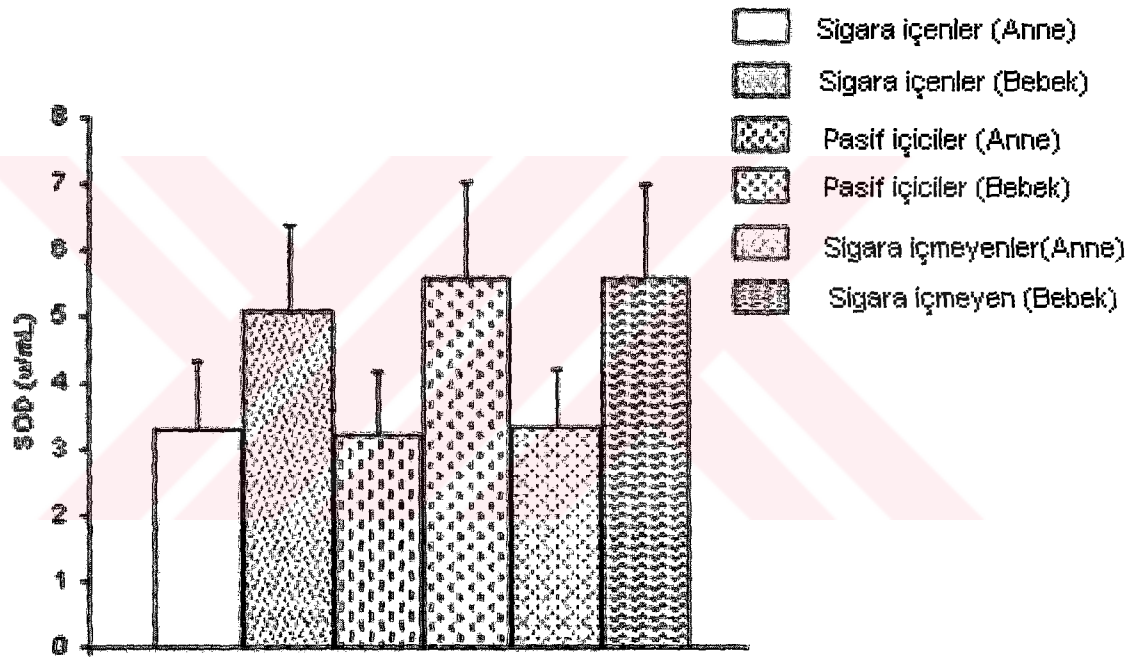
Bebek GPx aktiviteleri kendi aralarında ikişerli olarak analiz edildiğinde, istatistiksel anlamlı fark yalnızca aktif sigara içiciler ile sigara kullanmayan grup arasında saptandı ($p=0.015$). Aktif sigara içen gruptaki ortalama serum GPx aktiviteleri, pasif sigara içicilere göre daha yüksek olmakla beraber, istatistiksel anlamlı fark yoktu ($p=0.075$). Diğer yandan, pasif sigara içiciler ile sigara içmeyen grup arasında da istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.48$).



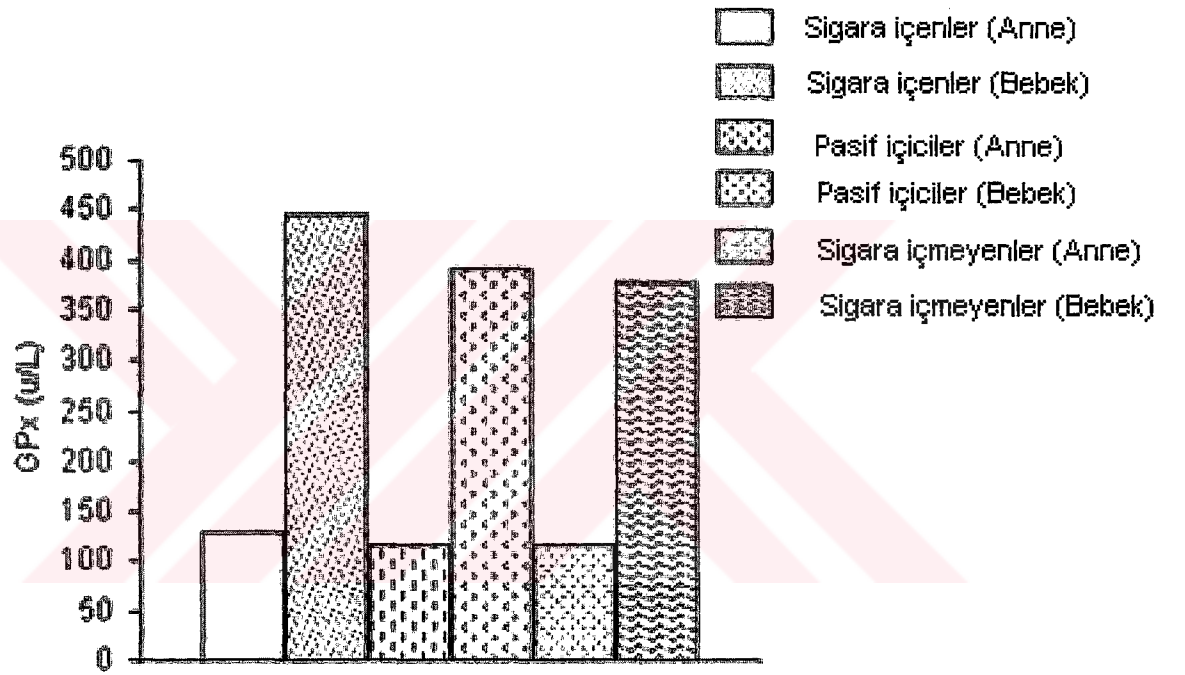
Journal of Pedagogical Research / Pedagogical Research Journal / Pedagogical Research Journal / Pedagogical Research Journal

113

Şekil 1. Çalışmaya Katılan Anne ve Bebeklerin Ortalama Serum MDA düzeylerinin Şematik Görünümü.



Şekil 2. Çalışmaya Katılan Anne ve Bebeklerinin Ortalama Serum SOD Aktivitelerinin Şematik Görünümü.



Şekil 3. Çalışmaya Katılan Anne ve Bebeklerinin Ortalama Serum GPx Aktivitelerinin Şematik Görünümü.

5. TARTIŞMA

Gebelik fizyolojik bir süreç olup, vücudun metabolik ihtiyaçları ve dokuların oksijen gereksinimi artmaktadır. Dokulardaki oksijen ihtiyacının artmasına bağlı olarak oksidatif stres ve lipit peroksidasyonu da artar. Yapılan çalışmalarda, gebelikte antioksidan savunma sistemlerinin modifiye edildiği gösterilmiştir. Bir kadın gebe kaldığında dolaşımdaki lipit peroksidleri artar (57,58). Bununla beraber vitamin E, seruloplazmin, eritrosit tipleri ve demir bağlama kapasitesi de artar (57,59). Düşük moleküllü antioksidanlardaki bu artışlara rağmen, antioksidan savunma sisteminin ana enzimlerinden olan SOD (60) ve GPx (61) aktiviteleri gebelerde düşmektedir. GPx, glutasyonu kofaktör olarak kullanarak lipit peroksidlerini daha zararsız olan yağ asitlerine, su ve glutasyon disülfid bileşiklerine çevirir.

Gebelikte oksidatif stresin majör kaynağı plasentadır. Placenta, poliansatüre yağ asitlerinden çok zengin olup, bir çok lipit peroksidleri buradan dolaşıma salınmaktadır. Normal gebelikte, plasentadaki bu lipit üretimi SOD, GPx, katalaz, glutasyon ve glutasyon redüktaz gibi plasental antioksidan enzimlerin kontrolü altındadır. Normal plasentada gebelik boyunca SOD ve katalaz aktiviteleri artarken, GPx aktivitesi düşer. Normal gebelik boyunca plasental lipit peroksidasyon üretimi azalırken, SOD ve katalaz aktiviteleri artmaktadır. Bu olay gebelikte plasental antioksidan savunma sistemlerinin lipit peroksidasyonunu önlemede yeterli olduğunu düşündürmektedir.

Sigara kullanan erişkinlerde, antioksidan savunma sistemlerinin bozulduğunu gösteren bir çok çalışma vardır. SOD ve GPx aktiviteleri sigara içen erişkinlerde daha düşük bulunmuştur (16,17). Bununla beraber, doku antioksidan savunma sistemlerinde değişiklik olmadığını (40,41) veya bu enzim aktivitelerinin artmış olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (18,19). Lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan TBARS ve MDA düzeyleride sigara içen erişkinlerde yüksek bulunmuştur (38,62). Çalışmalardaki bu farklılıklar yaş, cinsiyet, kişinin nütrisyonel durumu, kullanılan sigaranın cinsi ve değerlendirilen spesifik dokulardaki farklılıklara bağlanmaktadır (62).

Sigaranın gebe kadınlar ve bebekleri üzerine oksidatif bir stres kaynağı olduğunu gösteren biyokimyasal çalışma sayısı azdır. Annenin sigara içmesi placenta ve fetusta lipit peroksidasyonuna yol açarak, fetusta antioksidan savunma sistemlerini azaltabilir. Tek bir sigaranın bile, gebelerde geçici uteroplasental vazokonstriksiyon yaptığı gösterilmiştir (15). Sigaranın devamı ile iskemik-reperfüzyon atakları devam eder. Plasental aminoasit alımı sigara içenlerde düşüktür, buda fetusta glutasyon düşüklüğüne yol açar (15). Diğer yandan, oksidatif stresin bir göstergesi olan "breath

ethane" testi (n-3 yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşur), sigara içen annelerde ve bebeklerinde daha yüksek konsantrasyonda bulunmuştur (20).

Şimdiye kadar sigaranın gebeler ve bebeklerinin oksidan/antioksidan savunma sistemleri üzerine olan etkileri en kapsamlı olarak Bolisetty ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır (21). Doğumda ve postnatal 4. Günde, anne ve bebeklerinden alınan kanlardan MDA, E vitamini, A vitamini ve β -karoten bakılmıştır. Biz ise çalışmamızda aktif olarak sigara kullanan, pasif olarak sigaraya maruz kalan ve sigara kullanmayan annelerin ve yenidoğan bebeklerinin serum MDA düzeyleri, SOD ve GPx aktivitelerini araştırdık.

Çalışmamızda ilk defa pasif olarak sigaraya maruz kalan anneler ve bebekleri de değerlendirildi. Diğer yandan çalışma gruplarını oluştururken daha seçici davrandık. Erken doğumlar, doğum ağırlığı düşük olan bebekler, asfiktik doğan bebekler ve sezeryan doğumlar çalışmaya alınmadı. Ayrıca herhangi bir gebelik komplikasyonuna maruz kalan anneler de çalışmaya dahil edilmedi. Bu şekilde serum oksidan/antioksidan düzeylerine etki edebilecek diğer faktörler elimine edilmeye çalışıldı. Oysa, Bolisetty ve arkadaşlarının çalışmasında erken doğumlar, doğum ağırlığı düşük olan bebekler, sezeryan doğumlar ve postnatal çeşitli sorunları olan bebekler de çalışmaya dahil edilmiştir (21). Sigara'nın büyüme geriliğine neden olduğu iyi bilinmesine rağmen, çalışmamıza doğum ağırlığı normal olan bebekleri alarak bu çocuklarda bile vücudun oksidan/antioksidan durumunun etkilenip etkilenmediğini araştırdık. Biz, normal vajinal yoldan doğan bebekleri çalışmaya dahil ettik. Çünkü, sezeryan doğumlarda doğum stresi az olduğundan SOD aktivitesi normal doğumlara göre daha yüksek olmaktadır (13, 64). Çalışmamızda idrar kotinin seviyelerine bakılmamasını çalışmamızın bir eksiği olarak düşünmekteyiz. Diğer yandan kord kanı değerlerinin olması çalışmamızı daha anlamlı yapacaktı; ancak kord kanında çalışamadık.

Bolisetty ve arkadaşlarının çalışmasında, doğumdaki MDA düzeyleri sigara içen annelerde daha düşük bulunmuştur. Oysa, sigara içen ve sigara içmeyen annelerin bebeklerinin MDA düzeyleri arasında doğumda fark saptanmamıştır. Sigara içen annelerin postnatal 4.günündeki MDA düzeylerinde ise doğumdaki MDA düzeylerine göre anlamlı bir düşüş vardı. Bu düşüş sigara içen annelerin bebeklerinin MDA düzeylerinde de gözlenmiş ve anlamlı bulunmuştur. Postnatal 4. Günde MDA düzeylerinde gözlenen bu anlamlı azalma, annelerin bu dönemde sigara içmemeleri ile açıklanmaktadır. Sigara içmeyen anneler ve bebeklerin MDA düzeylerinde ise postnatal 4.günde anlamlı düşüş saptanmamıştır.

Bizim çalışmamızda da gruplar arasında hem annelerin hem de bebeklerinin postnatal 7. gündeki MDA düzeyleri arasında fark olmaması, sigara içen annelerin bu dönemde sigaraya ara vermelerinin bir sonucu olabilir. Bolisetty ve ark. çalışmasında antioksidan bir vitamin olan vitamin E değerleri sigara içen annelerin bebeklerinde doğumda anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu olay oksidatif strese karşı vücudun bir savunmasıdır ve E vitamini konsantrasyonu tüketim sonucu azalmaktadır. Yapılan başka bir çalışmada ise, sigara ile kord kanı vitamin E düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (63).

Biz ise çalışmamızda vücudun ana antioksidan enzimlerden olan SOD ve GPx aktivitelerini araştırdık. Çalışmaya katılan annelerin SOD aktiviteleri arasında ve bebeklerin ortalama serum SOD aktiviteleri arasında istatistiksel anlamlı fark yoktu. GPx aktiviteleri ise, hem annelerde hem de bebeklerinde anlamlı derecede farklılık gösterdi. Gruplar ikişerli olarak analiz edildiğinde ise, yalnızca aktif sigara içen annelerin bebekleri ile sigara içmeyen annelerin bebekleri arasında istatistiksel anlamlı fark vardı.

Normal doğumlarla sezeryan doğumların karşılaştırıldığı bir çalışmada, normal doğumlarda kord arter kanı GPx aktivitesi yüksek, SOD aktivitesi ise düşük bulunmuştur (64). Artmış GPx aktivitesi normal doğumlardaki oksidatif stresin bir sonucudur ve fetus artmış oksidatif strese GPx aktivitesini artırarak cevap vermektedir (64). Serbest radikalleri temizlerken SOD' nun kullanılması sonucu ise SOD aktivitesi düşmektedir (13, 64). Enzimlerdeki bu farklı cevaplar çelişkili gibi gözükse de, GPx uzun bir dönemi takiben oluşur ve lipit peroksitlerinin temizlenmesinden sorumludur. Oysa, SOD kısa bir dönemi takiben oluşur ve serbest oksijen radikallerinin temizlenmesinden sorumludur (64). Biz de sigara içen anne ve bunların bebeklerinde yüksek bulduğumuz GPx aktivitesini sigaraya bağlı oksidatif stresin bir sonucu olarak düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, çalışmamızda hem annelerin hem de bebeklerinin MDA düzeyleri ve SOD aktivitelerinde çalışma grupları arasında istatistiksel anlamlı farklar bulmadık. Oysa, GPx aktiviteleri sigara içen annelerde ve bunların bebeklerinde daha yüksek idi. Bu bulgu sigara içen anne ve bebeklerinin oksidatif strese maruz kaldıklarının bir göstergesi olarak düşünüldü.

6. SONUÇLAR

1. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum ABD da doğum yapmış 41 anne (yaş sınırları: 20-35) ve 7 günlük bebekleri çalışmaya alındı.
2. Doğum kayıtları ve annelerle karşılıklı görüşmeler sonucu, 41 anne ve bebeği uygun kriterleri sağlayarak üç gruba ayrıldılar: aktif sigara içiciler (n=12), pasif sigara içiciler (n=14) ve sigara içmeyen grup (n=15).
3. Postnatal 7. günde anne ve bebeklerden alınan kanlardan serum MDA düzeyleri, SOD ve GPx aktiviteleri çalışıldı.
4. Anne MDA düzeyleri her üç grupta benzer idi (p=0.63).
5. Anne SOD aktiviteleri her üç grupta benzer idi (p=0.98).
6. Aktif olarak sigara içen annelerde GPx aktivitesi diğer iki gruptan belirgin olarak yüksek bulundu (p=0.028).
7. Bebeklerin MDA düzeyleri her üç grupta benzer idi (p=0.96).
8. Bebeklerin SOD aktiviteleri her üç grupta benzer idi (p=0.73)
9. Aktif olarak sigara içen annelerin bebeklerinde GPx aktivitesi pasif sigara içici ve sigara içmeyen anne bebeklerine göre belirgin olarak yüksek idi (p=0.039).

KAYNAKLAR

1. Wei W, Kim Y, Boudreau N. Association of smoking with serum and dietary levels of antioxidants in adults: NHANES III, 1988-1994. *Am J Public Health* 2001; 91 (2):258-264.
2. Peto R, Lopez AD, Boreham J. Mortality from smoking in developed countries 1950-2000. Oxford: Oxford University Press, 1994: 650-660.
3. Peto R. Smoking and death: the past 40 years and the next 40. *BMJ* 1994; 309:937-939.
4. Zenzes MT. Cigarette smoking as a cause of delay in conception. *Reprod Med Rev* 1995; 4:189-205.
5. Adeno M, Gallagher H. Cigarette smoking and the age of menopause. *Ann Hum Biol* 1982; 9:121-130.
6. Royal College of Physicians. Nicotine addiction in Britain: a report of the Tobacco Advisory Group of the Royal College of Physicians. London: Royal College of Physicians, 2000.
7. Wakschlag L, Pickett K, Cook E, Benowitz N, Leventhal B. Maternal smoking during pregnancy and severe antisocial behavior in offspring: A review. *Am J Public Health* 2002; 92 (6):966-974.
8. Haglund B, Cnattingius S. Cigarette smoking as a risk factor for sudden infant death syndrome: a population based study. *Am J Public Health* 1990; 80:29-32.
9. Brook JS, Brook DW, Whiteman M. The influence of maternal smoking during pregnancy on the toddler's negativity. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 154:381-385.
10. McGee R, Stanton WR. Smoking in pregnancy and child development to age 9 years. *J Paediatr Child Health* 1994; 30:263-268.
11. Klesges LM, Johnson KC, Ward KD. Smoking cessation in pregnant women. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2001; 28:269-282.
12. Higgins S. Smoking in pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2002; 14(2):145-151.
13. Rogers MS, Mongelli JM, Tsang KH, Wang CC, Law KP. Lipid peroxidation in cord blood at birth: the effect of labour. *Brit J Obstet Gynaecol* 1998; 105:739-744.
14. Poranen AK, Ekbal U, Uotila P, Ahojupa M. Lipid peroxidation and antioxidants in normal and preeclamptic pregnancies. *Placenta* 1996; 17:401-405.
15. Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Tan D, Gitto P, Barberi S, Barberi I. Causes of oxidative stress in the pre-and perinatal period. *Biol Neonate* 2002; 81:146-157.

16. Kim SH, Kim JS, Shin HS, Keen CL. Influence of smoking on markers of oxidative stress and serum mineral concentrations in teenage girls in Korea. *Nutrition* 2003; 19:240-243.
17. Hulea SA, Olinescu R, Nita S. Cigarette smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stress: a case-control study. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1995; 14:173-180.
18. Abou-Seif MAM. Blood antioxidant status and urine sulfate and thiocyanate levels in smokers. *J Biochem Toxicol* 1996; 11:133-138.
19. Hilbert J, Mohsenin V. Adaptation of lung antioxidants to cigarette smoking in humans. *Chest* 1996; 110:916-920.
20. Schwarz KB, Cox JM, Sharma S. Prooxidant effects of maternal smoking and formula in newborn infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24:68-74.
21. Bolisetty S, Naidoo D, Lui K, Koh THHG, Watson D, Montgomery R, Whitehall J. Postnatal changes in maternal and neonatal plasma antioxidant vitamins and the influence of smoking. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2002; 86 (1):F36-40.
22. Eiserich JP, van der Vliet A, Handelman GJ, Halliwell B, Cross CE. Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:1490-1500.
23. Church DF, Pryor WA. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64:111-126.
24. Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 35 (1,2): 7-20.
25. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49:481-493.
26. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 1995.
27. Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato EF, Shindo M, Inoue M. Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation* 2002; 105 (10):1155-1157.
28. Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H. Reversible reduction in plasma concentration of nitric oxide induced by cigarette smoking in young adults. *Am J Cardiol* 1997; 79:1538-1541.
29. Yu PB. Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiol Rev* 1994; 74 (1):139-162.

30. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull* 1993; 49 (3):700-718.
31. Bulkley GB. Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: Aberrant triggering of reticuloendothelial function. *Lancet* 1994; 344 (10):934-936.
32. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr* 1991; 53(1):194-200.
33. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47(5):412-426.
34. Yıldırım A. İntakt ve adrenaletomili sıçanların eritrosit ve mide dokularında oksidan ve antioksidan parametrelerin araştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı, Erzurum, 2003
35. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction *FASEB J* 1997; 11(2):118-124.
36. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 108 (8):652-659.
37. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34 (6):879-886.
38. Chow CK. Cigarette smoking and oxidative damage in the lung. *Ann NY Acad Sci* 1993; 686:335-338.
39. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54:176-186.
40. Wurzel H, Yeh CC, Gairola C. Oxidative damage and antioxidant status in the lungs and bronchoalveolar lavage fluid of rats exposed chronically to cigarette smoke. *J Biochem Toxicol* 1995; 10:11-17.
41. Gupta MP, Khanduja KL, Sharma RR. Effect of cigarette smoke inhalation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the rat. *Toxicol Lett* 1998; 41:107-114.
42. Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD. Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis* 1995; 112:91-99.
43. Stryker WS, Kaplan LA, Stein EA, Stampfer MJ, Sober A, Willett WC. The relation of diet, cigarette smoking and alcohol consumption to plasma beta-carotene and alpha-tocopherol levels. *Am J Epidemiol* 1988; 127:283-296.
44. Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, Litin L, Willett WC. Correlations of vitamin A and E intakes with the plasma concentrations of carotenoids and tocopherols among American men and women. *J Nutr* 1992; 122:1792-1801.

45. Harats D, Ben-Naim M, Dabach Y, Havivi E, Stein O, Stein Y. Effect of vitamin C and E supplementation on susceptibility of plasma lipid proteins to peroxidation induced by acute smoking. *Atherosclerosis* 1990; 85:47-54.
46. Smith JL, Hodges RE. Serum levels of vitamin C in relation to dietary and supplemental intake of vitamin C in smokers and non-smokers. *Ann NY Acad Sci* 1987; 498:144-152.
47. Schectman G, Byrd JC, Gruchow HW. The influence of smoking on vitamin C status in adults. *Am J Public Health* 1989; 79:158-162.
48. Chow CK, Thacker RR, Changchit C. Lower levels of vitamin C and carotenes in plasma of cigarette smokers. *J Am Coll Nutr* 1986; 5:305-312.
49. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17:347-357.
50. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *Biomed Sci* 2000; 7 (6):444-458.
51. Swanson CA, Longnecker MP, Veillon C. Selenium intake, age, gender, and smoking in relation to indices of selenium status of adults residing in a seleniferous area. *Am J Clin Nutr* 1990; 52:858-862.
52. Lloyd B, Lloyd RS, Clayton B. Effect of smoking, alcohol, and other factors on the selenium status of a healthy population. *J Epidemiol Community Health* 1983; 37:213-217.
53. Robinson MF, Campbell DR, Sutherland WHF, Herbison GP, Paulin JM, Simpson FO. Selenium and risk factors for cardiovascular disease in New Zealand. *N Z Med J* 1983; 12:755-757.
54. Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989; 38:1539-1543.
55. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70:158-169.
56. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34:497-500.
57. Spatling L, Fallenstein F, Huch A, Huch R, Rooth G. The variability of cardiopulmonary adaptation to pregnancy at rest and during exercise. *Br J Obst Gynecol* 1992; 99:1-40.

58. Ishibara M. Studies on lipoperoxide of normal pregnant women and of patients with toxemia of pregnancy. *Clin Chim Acta* 1978; 84:1-9.
59. Davidge ST, Hubel CA, Brayden RD, Capelles EC, McLaughlin MK. Sera antioxidant activity in uncomplicated and pre-eclamptic pregnancies. *Obstet Gynecol* 1992; 79:897-901.
60. Wisdom SJ, Wilson R, Mckillop JH, Walker JJ. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 6:1701-1705.
61. Walsh SW, Wang Y. Secretion of lipid peroxides by the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:1462-1466.
62. Durak I, Elgun S, Bingol NK. Effects of cigarette smoking with different tar content on erythrocyte oxidant/antioxidant status. *Addict Biol* 2002; 7: 255-258.
63. Sajjad Y, Leonard M, Doyle M. Antioxidant levels in the cord blood of term fetus. *J Obstet and Gynaecol* 2000; 20 (5):468-471.
64. Kiely M, Cogan P, Kearney PJ. Relationship between smoking, dietary intakes and plasma levels of vitamin E and [beta]-carotene in matched maternal-cord pairs. *Int J Vitam Nutr Res* 1999; 69:262-267.