KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

TEKRARLAYAN DÜŞÜK (RECURRENT ABORTION) OLGULARINDA OKSİDAN - ANTİOKSİDAN DENGENİN L-KARNİTİN İLE İLİŞKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Müge KOPUZ

TRABZON-2008

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

TEKRARLAYAN DÜŞÜK (RECURRENT ABORTION) OLGULARINDA OKSİDAN - ANTİOKSİDAN DENGENİN L-KARNİTİN İLE İLİŞKİSİ

Müge KOPUZ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04.01.2008
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 24.01.2008

Tezin Danışmanı : Doç. Dr. S. Caner KARAHAN
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mehmet ÖZEREN

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Ocak, 2008

TRABZON

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı öncelikle, danışman hocam sayın Doç. Dr. S. Caner KARAHAN olmak üzere bilgilerinden faydalandığım saygı değer hocalarım Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Ekin ÖNDER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Doç. Dr.Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Doç. Dr. Birgül KURAL ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALVER'e teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım.

Çalışmanın planlanması ve örneklerin toplanmasındaki katkılarından dolayı Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Mehmet ÖZEREN' e ve Uzm. Dr. Aynur BACAK' a teşekkür ederim.

Çalışmalarımda benden yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Ahmet MENTEŞE, İbrahim TURAN, Dr. Utku UÇAR, Arş. Gör. Buket AKCAN, Gökçe OKUR, Dr. Fulya BALABAN, Dr. Kağan KILINÇ ve Arş.Gör. Ayşegül UZUN' a ve diğer çalışma arkadaşlarıma, Sağlık Bilimleri Enstitüsü yönetici ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve dostlarıma minnetimi sunar sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez K.T.Ü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (2004-114-002-4).

Müge KOPUZ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i
İÇİNDEKİLER ii
KISALTMALAR iv
ŞEKİLLER DİZİNİ v
TABLOLAR DİZİNİ vi
ÖZGEÇMİŞ vii
1 GİRİŞ 1
2 GENEL BİLGİLER 3
2.1 Tekrarlayan Düşük 3
2.1.1 Tekrarlayan Düşükte Etiyolojik Faktörler 4
2.1.1.1 Genetik Nedenler 4
2.1.1.2 Anatomik Nedenler / Servikal Yetersizlik / Uterus Patolojileri 5
2.1.1.3 Endokrinolojik Bozukluklar 6
2.1.1.4 Enfeksiyonlar 6
2.1.1.5 İmmunolojik Faktörler 7
2.1.1.6 Nütrisyonel ve Çevresel Nedenler 7
2.1.1.7 Koagülasyon sistemine ait patolojiler / Protrombik durum 8
2.1.1.8 Maternal Hastalıklar 8
2.1.1.9 Spermdeki yapısal ve fonksiyonel değişiklikler 8
2.2 Oksidan-Antioksidan Denge 9
2.2.1 Serbest Radikaller ve Oksidan Ajanlar 9
2.2.2 Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri 11
2.2.3 Antioksidanlar 14
2.2.3.1 Enzimatik Antioksidanlar 14
2.2.3.1.1 Glutatyon-S-Transferaz (GST) 15
2.2.3.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar 18
2.2.3.2.1 L- Karnitin 22
2.2.3.2.1.1 L-Karnitin ve Antioksidan Etkisi 23
2.3 Tekrarlayan Düşüklerde Antioksidan-Oksidan Denge 24

3 MATERYAL ve METOD 25
3.1 Materyal 25
3.1.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler 25
3.1.2 Kimyasal Maddeler 26
3.2 Metodlar 27
3.2.1 Deneyin Planlanması ve Örneklerin Toplanması 27
3.2.2 Total Antioksidan Kapasite Tayini 27
3.2.3 Total Oksidan Durum Tayini 29
3.2.4 Glutatyon-S-Transferaz (GST) Tayini 31
3.2.5 Malondealdehit (MDA) Tayini 32
3.2.6 L-Karnitin Tayini 34
3.3 İstatiksel Analizler 37
4 BULGULAR 38
5 TARTIŞMA 40
6 SONUÇLAR VE ÖNERİLER 45
7 ÖZET 47
8 SUMMARY 48
9 KAYNAKLAR 49

KISALTMALAR

GPx : Glutatyon peroksidaz

GR : Glutayon redüktaz

GST : Glutatyon-S-transferaz

SOD : Süperoksit Dismutaz

MDA : Malondealdehit

LH : Luteinleştirici Hormon

HCV : Sitomegalo Virüsü

HPV : Papilloma Virüs

AAV : Adenovirüs

ROS : Reaktif oksijen Türleri

NOS : Reaktif Nitrojen Türleri

DNA : Deoksiribonükleik asit

GSH : Glutatyon

CDNB : 1-kloro-2,4-dinitrobenzen

CAT : Asetil transferaz

ACS : Asetil CoA Sentetaz

MK : Miyokinaz

PK : Piruvat Kinaz

LDH : Laktat Dehidrogenaz

CoA : koenzim A

ATP : adenosin-5'-trifosfat

ADP : adenozin-5'-difosfat

AMP : adenozin-5'-monofosfat

PP_i : inorganik pirofosfat

PEP : fosfoenol piruvat

NADH : nikotinamid adenin dinükleotid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Serbest radikal kaynakları ve oluşum mekanizmaları

Şekil 2. Reaktif oksijen türleri etkisiyle oluşan hücre hasarı mekanizması

Şekil 3. Antioksidan enzimler ve katalizledikleri reaksiyonlar

Şekil 4. Enzimatik detoksifikasyon mekanizmasının safhaları

Şekil 5. L-Karnitin Kimyasal Yapısı

Şekil 6. Total antioksidan durum tayini standart grafiği

Şekil 7. Total oksidan durum tayini standart grafiği

Şekil 8. Glutatyon-S-transferaz aktivitesi tayininin esasını oluşturan reaksiyon.

Şekil 9. MDA Standart Grafiği

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Glutatyon-S-transferaz enziminin izoenzimleri ve fonksiyonları

Tablo 2. Glutatyon-S-Transferaz enzimlerinin substratları

Tablo 3. Enzimatik olmayan antioksidanlar ve etki mekanizmaları

Tablo 4. Hesaplanan L- Karnitin standart sonuçları

Tablo 5. Tekrarlayan düşük görülen hastalar ve sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubuna ait demografik veriler.

Tablo 6. Tekrarlayan düşük görülen hastalar ve sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubunda ölçülen bazı oksidan-antioksidan denge parametreleri

1 GİRİŞ

Tekrarlayan düşük birbirini izleyen en az iki ya da daha fazla gebeliğin spontan olarak sonlanmasıdır. Gebeliğin en sık rastlanan komplikasyonu olan düşüğün insidansı yaklaşık % 10-14, tekrarlayan düşük oranı ise % 0.5-3 arasındadır. Tekrarlayan düşük olgularında etyolojinin aydınlatılması ve prognostik faktörlerin belirlenmesi yetersiz kalınan konulardan biridir (1). Bu nedenle tekrarlayan düşük olgularının yaklaşık % 50 kadarında bir sebep bulunamamıştır. Günümüze kadar açıklığa kavuşturulmuş sebepler ya da aracılık eden faktörler, kromozomal bozukluklar, uterus patolojileri, protrombotik durum, endokrin bozukluklar, immünolojik faktörler, servikal yetersizlikler, enfeksiyonlar, nütrisyonel ve çevresel faktörler, maternal hastalıklar, spermdeki yapısal ve fonksiyonel değişiklikler şeklinde sıralanabilir(2).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri veya diğer serbest radikallerin üretiminin artmasına ya da antioksidan defansın yetersizliğine neden olan durumların bir sonucu olarak ortaya çıkar (3). Antioksidan sistem; antioksidan etki gösteren enzimleri ve enzim olmayan bileşikleri içermektedir. Glutatyon peroksidaz (GPx), Glutayon redüktaz (GR), Glutatyon-S-transferaz (GST), Katalaz ve Süperoksit Dismutaz (SOD) antioksidan sistemin enzimleridir. Glutatyon,Vitamin B, Vitamin E, Ürik asit, Bilirubin, Albümin, Seruloplazmin, Selenyum, β-karoten gibi bileşikler de antioksidan sistemin önemli molekülleri arasındadır (4). Diabetes mellitus, ateroskleroz, kalp ve böbrek hastalıkları, eklem hastalıkları ve kanser gibi birçok patolojik tablonun etyolojisinde veya kliniğinde serbest radikallerin rol oynadığı bilinmektedir. Son yıllarda gebelik ve komplikasyonlarının ortaya çıkmasında serbest radikallerin etkisini ortaya koyan çalışmalar artmıştır (5).

Glutayon-S-transferazlar, dimerik yapıda sitozolik enzimler olup endojen ve eksojen pek çok toksik bileşiğin detoksifikasyonunu sağlayan sistemin bir parçasıdırlar (6). GST aktivitesi insanda tüm dokularda bulunmaktadır(7). Glutatyon-S-transferazlar sitozolde bulunan 8 adet izoenzimi (GSTA, GSTM, GSTP, GSTK, GSTT, GSTZ, GSTS ve GSTO) bulanan bir enzim ailesidir. Glutatyon-S-transferaz enzimlerinin en iyi bilinen fonksiyonları, endojen ve ekzojen toksik bileşiklerin elektrofilik merkezlerine glutatyonu bağlayarak bu toksik bileşiklerin çözünürlüğünün arttırılması ve kolay bir şekilde hücre

dışına atılabilmelerini sağlar. Glutatyon-S-transferazların, oksidatif strese bağlı hasarın önlenmesinde önemli bir antioksidan defans rolü oynadığı belirtilmektedir. Glutatyon-S-transferaz enzimleri oksijen ve lipid peroksidasyonu ürünlerinin detoksifikasyonunu katalizlerler ve oksidatif stresi azaltırlar (6).

L-Karnitin (γ-trimetilamino-β-hidroksi bütirik asit), vücutta yaygın bir doku dağılımına sahip olup kuarterner amin yapısındadır. Yağ asitlerinin ve yağ asidi türevlerinin mitokondriye taşınmasında görevli olan bir moleküldür. L-Karnitin sentezi lizin ve metiyonin amino asitleri öncülüğünde karaciğer böbrek ve beyinde gerçekleşmektedir (8). L-Karnitinin iskelet ve kalp kasındaki miktarı karaciğer, böbrek ve beyindeki miktarının üç katıdır. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, L-Karnitin' in bu fonksiyonunun yanında antioksidan etki gösterdiği de belirtilmiştir. L-Karnitin ve bazı esterlerinin (asetil-L-Karnitin) ksantin oksidazı kısmen inhibe ettiği ve buna bağlı olarak hipoksi-reoksijenasyon (iskemi-reperfüzyon) hasarını engellediği ifade edilmektedir. Shug ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda asetil-L-karnitinin mitokondriyel süperoksit anyon üretimini inhibe ettiğini gösterilmiştir (9). Ayrıca, karnitin ve karnitin türevlerinin enerji üretimine direkt ya da indirekt aracılık eden molekülleri oksidatif hasardan koruduğu ve hasarlı biyomoleküllerin tamirine aracılık edebileceğini ifade edilmiştir. L-Karnitin' in bir şelatör olarak etki ederek lipit peroksidasyonunu indükleyen metal iyonlarının (Fe) miktarını azalttığı gösterilmiştir. L-Karnitinin glutatyon miktarını arttırdığı da ifade edilmektedir (10).

Bu çalışmada; etiyopatogenezinin ancak bir kısmı açıklığa kavuşturulabildiği için takip ve tedavi stratejisi hala tartışmalı olan tekrarlayan düşük olgularında oksidan-antioksidan dengenin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu şahıslarda son yıllarda antioksidan fonksiyonları nedeniyle çalışmalarda ilgi odağı haline gelen GST ve L-Karnitin miktarları da tayin edilerek oksidan-antioksidan denge ile karşılaştırılacaktır. Bu amaca yönelik olarak tekrarlayan düşük klinik tanısı alan şahıslardan ve normal doğum yapmış sağlıklı şahıslardan alınan kan örneklerinde total oksidan durum, Malondealdehit (MDA), total antioksidan kapasite, GST ve L-Karnitin seviyeleri analiz edilerek birbiri ile kıyaslanacaktır. Çalışmada elde edilecek sonuçların yorumlanması ile tekrarlayan düşük olgularında etiyopatogenezin açıklığa kavuşturulması ve bu vakalara yaklaşımda önemli bir katkı sağlanacağı kanaatindeyiz.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Tekrarlayan Düşük

Tekrarlayan düşük birbirini izleyen en az iki ya da daha fazla gebeliğin 20. gebelik haftasından önce spontan olarak sonlanmasıdır.(2) Bazı klinisyenler tekrarlayan düşüğü üç ya da daha fazla gebeliğin ardışık olarak sonlaması şeklinde tanımlamaktadırlar. Gebeliğin en sık rastlanan komplikasyonu olan düşüğün insidansı, klinik olarak tanısı konulmuş gebeliklerde yaklaşık % 10-14 arasındadır. Her ne kadar gebelik kayıpları klinik olarak % 15 oranında görülse de, toplam üretkenlik kaybı oranı % 50' yeyaklaşmaktadır. Tekrarlayan düşük oranı ise % 0.5-3 arasındadır (11). Epidemolojik çalışmalar, peş peşe gerçekleşen her düşüğün bir sonraki gebelikte düşük yapma riskini arttırdığını göstermektedir(1). Bu oranın iki klinik düşükten sonra % 24, üç düşükten sonra % 30 ve 4 ardışık düşükten sonra % 40 olduğunu ifade etmektedirler (2).

Toplumumuzdaki üreme alışkanlıkları değişmiştir. Birçok bayan çocuk sahibi olmayı ertelemektedir. İngiltere nüfus verilerine göre, 1985 ile 2005 yılları arasına doğan ve yaşının 35 veya daha üstü bayanların doğurduğu bebeklerin oranı % 8' den % 16' ya yükselmiştir. Yapılan bir çalışmada, düşükler için çok güçlü bir risk faktörü olan anne olma yaşının, kromozomal bozuklukların oluşması ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmektedir. Fetal kayıp riski 35 yaşından sonra kademeli olarak artmaktadır. 20-24 yaşları arasında % 9 olan bu oran 45 yaşından sonra % 75' e yükselmektedir. 40 ve daha sonrası yaşlarda olan bayanların başarılı bir gebelik geçirme şansı çok düşüktür(11).

2.1.1 Tekrarlayan Düşükte Etiyolojik Faktörler

Tekrarlayan düşük gözlenen hastalarda etiyolojiye yönelik yapılan çalışmalarda, etiyolojilerinin ancak % 50' si aydınlatılabilmiştir. Tekrarlayan düşüklerin belirlenebilmiş etiyolojik faktörleri birkaç ana başlıkta sıralanmaktadır.

1) Kromozomal bozukluklar
2) Anatomik nedenler / Servikal yetersizlik
3) Endokrinolojik bozukluklar
4) Enfeksiyonlar
5) İmmünolojik faktörler
6) Nütrisyonel ve Çevresel nedenler
7) Koagülasyon sistemine ait patolojiler /Protrombotik durum
8) Maternal hastalıklar
9) Spermdeki yapısal ve fonksiyonel değişiklikler (12).

2.1.1.1 Genetik Nedenler:

Tekrarlayan gebelik kayıplarının etyolojisinde %3 sıklıkta genetik nedenler sorumlu tutulmaktadır (13). Genetik anomaliler fetal veya maternal kaynaklı olabilir. Genel kural olarak düşük ne kadar erken oluşursa kromozomal kaynaklı olma olasılığı o kadar fazladır. Birinci trimester kayıplarının %60'ı, ikinci trimester kayıplarının %10-15'i, üçüncü trimester ölü doğumlarının ise %5'i genetik hatalardan kaynaklanmaktadır (13,14). Genetik anomalileri yapısal ve sayısal olarak sınıflamak mümkündür. Gametogenezdeki kromozomal hatalar trizomi, monozomi X, poliploidi gibi total kromozom sayısında gerçekleşen normalden sapmalar olarak tanımlanabilir(10). Tekrarlayan düşük görülen bayanlardaki düşüklere sebep olabileceği düşünülerek Monozomi X tarafından takip edilen kromozom 13, 14, 15, 16, 21 ve 22 için nokta otozomal trizomiler araştırılmıştır (2). Yapısal anomaliler ise translokasyon, delesyon, inversiyon ve ringler gibi kromozomun kendisinde gerçekleşen morfolojik patolojilerdir. Yapısal kromozom anomalileri içerisinde en sık translokasyonlar, translokasyonlar içerisinde ise resiprokal ve robertsonian tipi translokasyonlar görülmektedir (15). Ayrılmama yada translokasyona bağlı otozomal trizomi en sık rastlanan anomalidir (erken

gebelik düşüklerinin yaklaşık %50'si). Bu yapıların sitogenetik analizi yapıldığı taktirde %50 sıklıkta trizomiler, %15 sıklıkta monozomi X ve değişen oranlarda poliploidi ile karşılaşılır. Tekrarlayan düşük görülen bayanlar heterotrizomiye yatkındırlar. Heterotrizomi, trizomik gebelikten sonra değişik bir trizomi çeşidinin tekrar ortaya çıkmasıdır (11).

2.1.1.2 Anatomik nedenler / Servikal yetersizlik / Uterus patolojileri

Tekrarlayan gebelik kayıplarının etyolojisinde yaklaşık %12-15 oranında anatomik nedenler sorumludur. Uterin arter anomalileri implante olan blastosist ve gelişen plasentaya giden kan akımını etkileyerek gebelik kaybına yol açabilir. Unikornuat veya bikornuat uterus, uterus didelfis ve servikal yetmezlik 2. trimester kayıplarına neden olur. Potansiyel olarak gebelik kaybına yol açan akkiz anatomik anomaliler arasında intrauterin adezyonlar, leiomyomlar ve endometriosis vardır. Bu durumlarla tekrarlayan gebelik kaybı arasındaki ilişki zayıftır. Ancak adezyon ve myomlarda muhtemel mekanizma kan desteğinin bozulması iken endometriosiste immünolojik fenomen sorumlu tutulmaktadır (16).

Transservikal embriyoskopi, aneuploid embriyoların düzensiz bir büyüme ve gelişime sahip olduğunu göstermektedir. Benzeri bozuklukların düşükle sonlanan euploid gebeliklerin oranını % 18' e taşıdığı bulunmuştur. Doğuştan olan uterus bozukluklarının popülasyondaki frekansı bilinmemektedir. Fakat tekrarlayan düşüklü bayanların oranının % 1.8 ile % 37.6 arasında olduğu rapor edilmiştir (11).

Uterus fibroid (lifli tümör) görülen bayanların % 30' dan fazlasında tekrarlayan düşük görülmektedir. İnvitro döllenme sonrası implantasyondaki başarısızlıkların intramural veya submukozal fibroidlere bağlı olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir. Ağrısız servikal açılmaların veya spontan membran kırılmalarının öne geçtiği geç dönem düşüklerde dayandırılan servikal yetersizlik tanısı tekralayan düşüklerde 2. trimesterda görülür (12).

2.1.1.3 Endokrinolojik Bozukluklar:

Tekrarlayan düşükler ile ilgili endokrinolojik faktörler arasında polikistik over sendromu, diabetes mellitus, luteal faz yetmezliği ve tiroid fonksiyon bozuklukları gibi sebepler yer alır (16). Polikistik over sendromu androjen biyosentezindeki bozukluk sonucu oluşan hiperandrogenizm tablosudur. Bu sendromun bulunduğu bayanlarda luteinleştirci hormonun (LH) sekresyonu artar. LH sekresyonundaki artış, östrojen ve testosteron düzeylerindeki artışla endometriyum veya oosit gelişimini ters yönde etkiler. Polikistik over sendromlu bayanların % 25-40' ı düşük yapma riskine sahiptirler.

Tiroid otoantikorları pozitif kabul edilen bayanların düşük yapma oranı % 17' dir. İnsuline bağımlı diyabeti olan bayanların erken gebelik dönemlerinde düşük yapma olasılığı % 15-45 arasında değişmektedir(2).

Menstrual siklusun luteal fazında endometriyal prolaktin ekspresyonunun eksikliği tekrarlayan düşükler ile bağlantılıdır. Prolaktin, hem ovulasyonda hem de endometriyal olgunlaşmada rol oynamaktadır. Ayrıca, hiperprolaktineminin tekrarlayan düşüklere sebep olduğu belirtilmektedir(11).

2.1.1.4 Enfeksiyonlar :

Tekrarlayan spontan düşüklerde özel enfeksiyon ajanlarını etyolojik faktörler olarak ortaya koyan düzenli raporlara rağmen bakteriyal ya da viral enfeksiyonların tekrarlayan düşüklere neden olduğuna dair tartışmalar devam etmektedir (11). Gebeliğin ikinci trimester' ında çeşitli enfeksiyonların tekrarlayan düşüklere neden olabileceği fakat ilk trimesterdaki enfeksiyonların rolünün hala tartışılması gerektiği belirtilmektedir. Enfeksiyonun plasenta ve fetusa giden ana yolu serviks ve vajinadır. Herhangi bir mikroorganizma ile tekrarlayan gebelik kaybı arasında pozitif bir ilişki var diyebilmek için mikroorganizmanın plasentada, fetüste veya annede tespit edilmesi gerekir. *Chlamydia trachomatis*, spesifik bakteriyal proteinlere karşı güçlü immunolojik reaksiyonlar ile tekrarlayan düşükleri tetikleyebilir. Serviksteki *Chlamydia trachomatis* enfeksiyonu ikinci trimester düşüklerle ve prematüre membran kopması ile ilişkilendirilmektedir. *C. trachomatis, Ureaplasmaurealyticum, Myeoplasma hominis*, Sitomegalo Virüsü (HCV), Papilloma Virüs (HPV) ve Adenovirüs (AAV) gebelerde tekrarlayan düşüğün en önemli sebeplerindendir(2).

2.1.1.5 İmmunolojik faktörler:

Otoimmün ve alloimmün faktörler tekrarlayan düşük görülen bayanların gebeliklerindeki immünolojik bozukluklarda önemli rol oynamaktadır. Anne ve fetus arasındaki immünoljik ilişki, bir tarafta bu antijenlerin maternal immun sistem tarafından tanınması ve etkileşimini oluşturan çift taraflı iletişimdir. Gebelikteki immunolojik tanıma gebelik süresinin korunumu için önemlidir. Lupus antikoagulan ve antikardiyolipin antikorlar otoimmün bir hastalık sonucu artan antifosfolipit antikorlardır. Bu antikorlar sadece Sistemik Lupus Eritematosus'a özgü olmayıp bir dizi klinik problemde ortaya çıkabilirler. Trombosit ve damar endoteline karşı gelişen bu antikorlar tromboza, tekrarlayan düşüklere ve fetal kayıplara yol açarlar. Çeşitli araştırmalar tekrarlayan düşüğü olan kadınların %10-16'sında antifosfolipit antikorları varlığını ortaya koymuştur. Alloimmünite plasental veya fetal dokulardaki antijenlere karşı anormal maternal bağışık yanıtla ilişkili tüm tekrarlayan düşük nedenlerini içerir(2,11).

2.1.1.6 Nütrisyonel ve Çevresel Nedenler:

Kemoterapötik ilaçlar, radyoaktif iyonlar, etilen oksit, civa ve kurşun gibi çevresel toksinler düşüklere sebep olabilir. Sigara, alkol ve kahve tüketiminin tekrarlayan düşüklerle bağlantılı olduğu belirtilmektedir ve bu maddelerin aşırı kullanımı düşük riskini arttırmaktadır. Tekrarlayan düşük oranı stres ve psikolojik problemler ile artmaktadır (2). Optik ekran birimleriyle çalışmak gibi bazı mesleki durumların düşük riskini kuvvetlendirdiği ifade edilmektedir. Düşük oranı, non-steroid antiinflamatuar ve anti-depresan ilaçların kullanılmasıyla artabilir. Ayrıca obezitenin düşük için bir risk faktörü olduğu belirtilmektedir (11).

2.1.1.7 Koagülasyon sistemine ait patolojiler /Protrombotik durum

Başarılı bir gebelik için, kuagülasyon, fibrinozis ve vasküler remodeling süreçleri arasında dengenin ayarlanması gerekmektedir. Desidual damarlardaki trombozis, tekrarlayan düşüklerin önemli nedenlerinden biridir. Plasenta kanallarındaki aşırı trombozis, plasental infaktüs ve ikincil uteroplasental yetersizlik ile açıklanabilir (2). Takrarlayan düşük kliniğine sahip bayanlarda bireysel koagülasyon bozukluklarının kontrollere göre daha sık rastlandığını ifade eden çalışmalar mevcuttur. Tekralayan düşük olgularında faktör V (Leiden) G1691A, faktör II (protrombin) G20210A ve metilen hidrofolat redüktaz C677T gibi üç önemli trombofilik mutasyon varlığı gösterilmiştir (11).

2.1.1.8 Maternal hastalıklar

Maternal hastalıklar, fetal kayıp riskini arttırmaktadır. Bu risk, Ehler-Danlos sendromu ve Marfan sendromu gibi nadir gözüken doku bozukluklarını içermektedir. Orak hücre anemisi, disfibrinojemi, kongenital hipofibrinojenemi, afibrinojenemi, Wilson hastalığı, diabetus mellitus, tiroid hastalıkları, kronik esansiyel hipertansiyon, renal hastalıklar ve hiperhomosisteinemi gibi hastalıklar annelerde tekrarlayan düşüklere sebep olabilir (2).

2.1.1.9 Spermdeki yapısal ve fonksiyonel değişiklikler

Hiperspermi (250 milyon/mL' den fazla) ve oligospermi (20 milyon/mL' den az) düşükle bağlantılıdır. Buckett ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada açıklanamayan ilk trimester de tekrarlayan düşük görülen bayanların partnerlerinden alınan meni örnekleri ile yapılan hipo-osmotik şişirme testinin sonuçları anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (2).

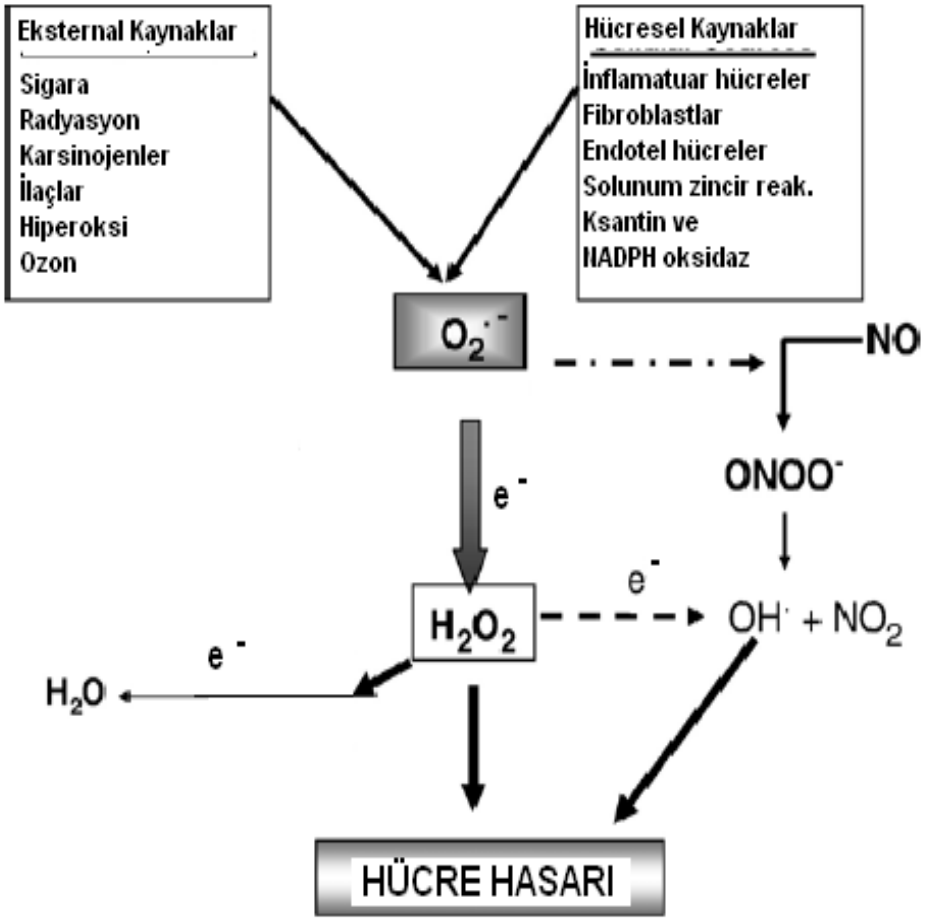
2.2 Oksidan-Antioksidan Denge

Biyolojik sistemlerde, aerobik metabolizmanın normal ürünü olarak serbest radikaller ve diğer güçlü oksidanlar açığa çıkar. Antioksidan savunma sistemleri ise reaktif oksijen türlerinin ve diğer oksijan ajanların oluşumunu engeller, nötralizasyonunu sağlar, ortadan kaldırılmasını veya bunların meydana getireceği hasarı önlemek için çalışmaktadır (17). Sağlıklı organizmalarda, oksidan etki ile antioksidan sistem arasında bir denge vardır. Bu denge oksidan etki lehine bozulduğunda oksidatif stres oluşmaktadır (18).

2.2.1 Serbest Radikaller ve Oksidan Ajanlar

Ortaklanmamış elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi taşıyan atom veya moleküllere serbest radikal adı verilmektedir. İnsan vücudundaki bütün hücrelere kolayca giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan moleküler oksijen (O_2), yapısı itibariyle radikal olmaya çok uygun olduğundan serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir tabirle reaktif oksijen türleri (ROS) akla gelmektedir (19).

Serbest radikaller çözeltide veya bir lipid ortamda bağımsız olarak bulunan radikallerdir (20). Tüm aerobik organizmaların hücresel metabolik süreçlerinde oksijenin suya indirgenmesi sırasında canlı dokulara toksik özellikte serbest radikaller ortaya çıkmaktadır. Canlı sistemlerdeki serbest radikal kaynakları ve bunların oluşum mekanizması Şekil 1' de kısaca özetlenmiştir. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (NOS) serbest radikallerin başlıca iki çeşitidir. Serbest radikal türleri, aktif ve kararsızdır. Karbohidratlar, proteinler, lipidler, nükleik asitler veya benzeri moleküllerden elektron alarak kararlı hale gelirler (4).



Şekil 1. Serbest radikal kaynakları ve oluşum mekanizmaları (21).

2.2.2 Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Serbest oksijen radikalleri, mitokondrial solunum, trombosit aktivasyonu, lökosit fagositozu ve prostaglandin sentezi gibi yaşamsal süreçlerde rol oynamasına rağmen lipidler başta olmak üzere, proteinler, DNA ve karbonhidratlar üzerine toksik etkiye sahiptirler (Şekil 2). Bu yolla hücrelerde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara sebep olabilirler. (17,22,23).

Serbest radikallerin lipidler üzerine etkisi ile lipid peroksidasyonu meydana gelir (24). Lipid peroksidasyonu, membran ve lipoproteinlerin yapısında yer alan poliansatüre yağ asitlerinin oksitleyici ajanların etkisi sonucu meydana gelir (25). Bu peroksidasyon kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve geri dönüşü olmayan membran hasarına yol açar.

$LH + {}^{\cdot}OH \longrightarrow H_2O + L^{\cdot}$ (Lipid radikali)

$L^{\cdot} + O_2 \longrightarrow LOO^{\cdot}$ (Lipid peroksil radikali)

$LOO^{\cdot} + LH \longrightarrow L^{\cdot} + LOOH$ (Lipid peroksit)

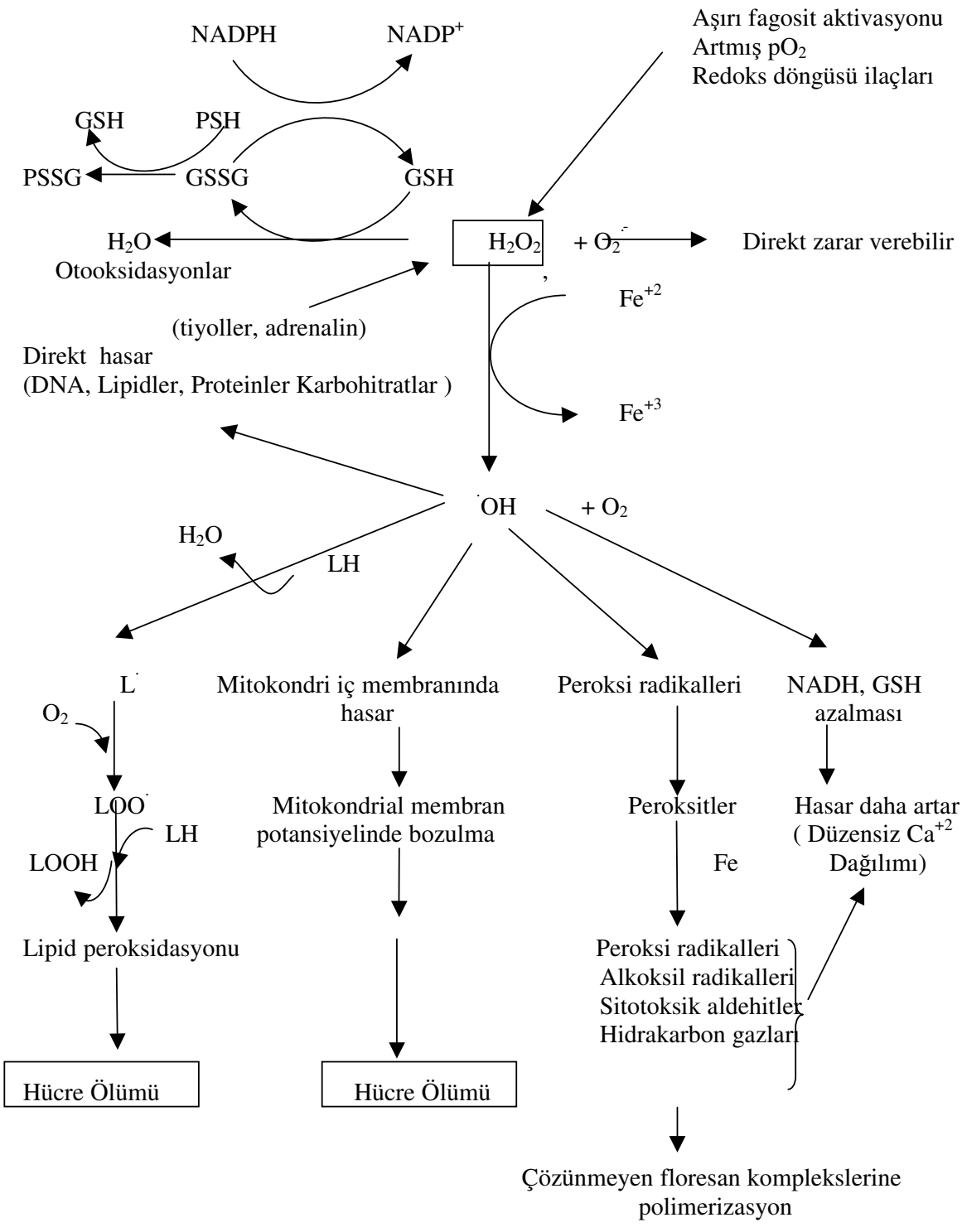
$LOOH \longrightarrow LOO^{\cdot}$ Malondialdehit (26,27).

Lipid peroksidasyonu sonucunda malondealdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE), lipid hidroperoksitleri gibi oldukça toksik ve zararlı yan ürünler ortaya çıkar. Malondialdehit, oldukça reaktif bir aldehit türevi olup proteinlerin serbest amino grupları, fosfolipidler veya nükleik asitlerle reaksiyona girerek biyolojik moleküllerde yapısal modifikasyonlara neden olur. Membranların yapıları bozulur, geçirgenlikleri değişir, iyon transportu ve enzimatik aktiviteler gibi fonksiyonlar etkilenir (28).

Serbest radikallerin proteinler üzerine etkileri, amino asit bileşimlerine bağlıdır. Yapılarında sistein, sistin, metiyonin, histidin, triptofan, tirozin gibi amino asitleri fazlaca bulunduran proteinler radikallerin oksitleyici etkisine daha fazla duyarlıdır. Doymamış çift bağ ihtiva eden ve kükürt içeren moleküllerin de serbest radikallere duyarlılığı çok fazladır. Oksijen radikalleri, peptit bağlarının hidrolizi, disülfid bağı teşekkülü ve çapraz bağlanmalara yol açabilirler. Bazı amino asit kalıntıları, karbonil türevlerine dönüşür. Bu oksidatif değişikliklerden sonra proteinler, proteolitik parçalanmaya karşı daha hassas olurlar. Protein yapısında olan enzimler, aktivite kaybına uğrayabilir. Örneğin, Na-K-ATPaz enziminin tiyol gruplarının oksidasyonu sonucu aktivite kaybı, böylece hücre içi ve dışı iyon dağılımı bozulabilir (23,29) .

Hidroksil radikali özellikle DNA'da deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek bazların modifikasyonuna ve zincir kısalmasına yol açar. Ayrıca DNA polimerazı inhibe eder, bu yüzden hücre ölümüne kadar giden süreçleri başlatır, hücre yaşlanmasını hızlandırır ve karsinogenezise yol açabilir (26,30).

Serbest radikaller hücrede enerji metabolizmasını da etkiler. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzimini inhibe ederek $NADH_2$ azalmasına ve glikolizle ATP sentezinde azalmaya sebep olurlar. Mitokondrilerde ise radikallerin etkisi ile hem iç membran bütünlüğünün bozulması hem de ATP sentetaz aktivitesinde azalma sonucu ATP seviyesinde bir düşüş olur. Süperoksit radikali hiyaluronik asit parçalanmasına yol açarak inflamatuar eklem hastalıklarının patolojik sürecinde rol oynar (23,31).



Şekil 2. Reaktif oksijen türleri etkisiyle oluşan hücre hasarı mekanizması (32).

2.2.3 Antioksidanlar

Canlı sistemlerde reaktif oksijen türlerinin ve diğer oksidan moleküllerin seviyelerini düzenleyecek ve bunların oluşturduğu hasarı önleyebilecek bir çok savunma mekanizması mevcuttur. Antioksidan savunma sistemi veya kısaca antioksidanlar olarak da bilinen bu mekanizmalar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engeller ve/veya reaktif oksijen türlerini (serbest radikalleri) nontoksik bileşiklere döndürürler. Antioksidan sisteme ait moleküller başlıca hücrenin sitoplazmasında ve membranında bulunurlar (17).

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler;

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirme yoludur. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etkisini gösterirler.

2. Söndürme etkisi (Quenching): Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol gibi oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive ederler.

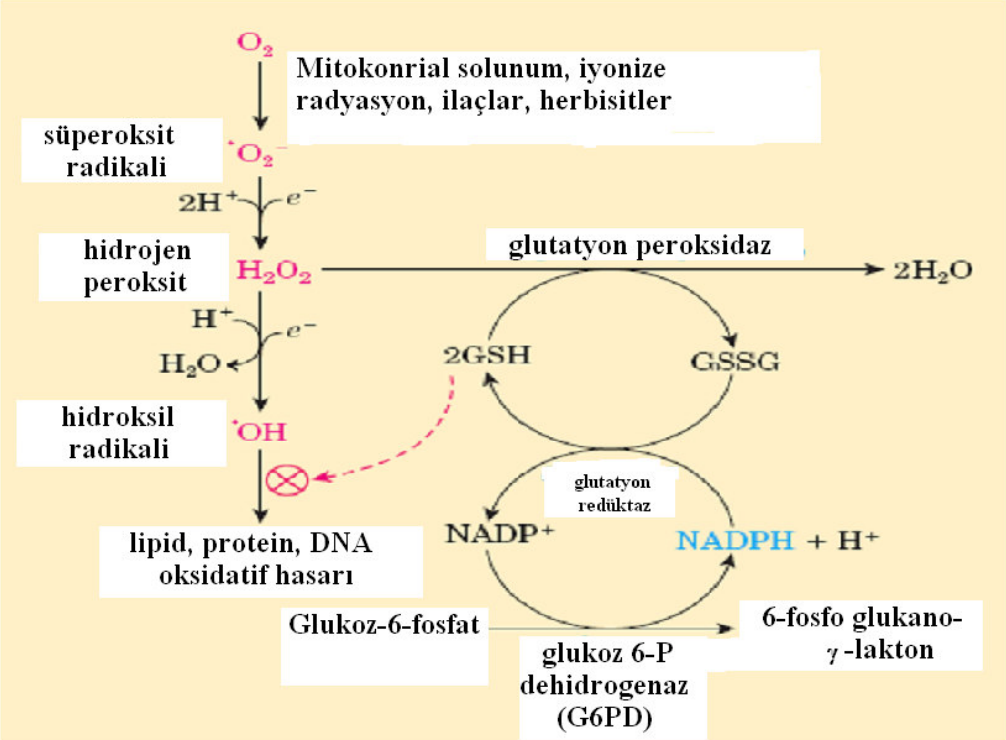
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.

4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar (33).

İnsan vücudundaki antioksidanlar; enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki gruba ayrılmaktadır (34).

2.2.3.1 Enzimatik Antioksidanlar

Doğal antioksidanlar olarak da bilinen enzimatik antioksidanlar aşırı ROS etkilerini nötralize ederler ve hücresel yapı hasarını engellerler. Başlıca antioksidan enzimler; superoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve glutatyon-S-transferaz (GST) şeklinde sıralanabilir (34). Şekil 3’ de SOD, GPx, GR ve katalaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar gösterilmiştir.



Şekil 3. Antioksidan enzimler ve katalizledikleri reaksiyonlar

2.2.3.1.1 Glutatyon-S-Tranferaz (GST)

Glutatyon-S-transferazlar (E.C.2.5.1.18) çoğunlukla sitoplazmada bulunan majör faz II detoksitoksifikasyon enzimleridir (6,36).

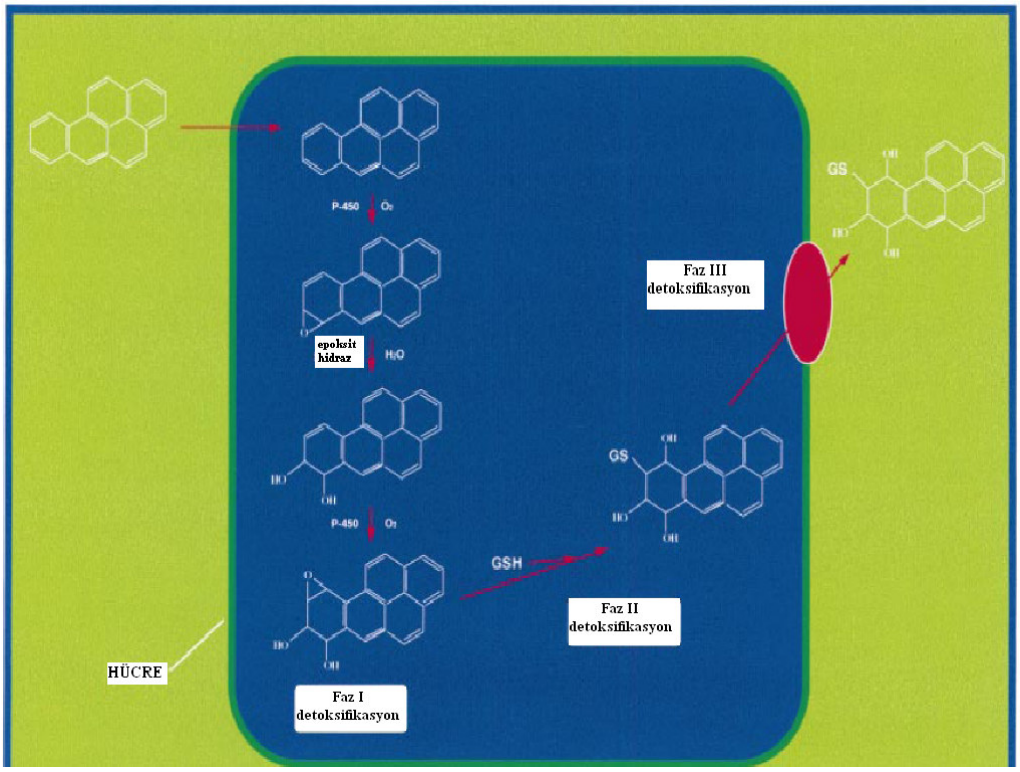
Dimerik yapıdaki GST enzimlerin monomerlerinde 3 α-heliks, 4 β- sheet zinciri bulunmaktadır. Dört farklı tür monemerin çeşitli kombinasyonlarla oluşturdukları heterodimerik veya homodimerik yapılarla GST enzim ailesinin izomerleri oluşur (6). Glutatyon-S-transferaz enzimleri primer yapılarına, immünolojik özelliklerine ve substrat spesifikliklerine göre 8 sınıfa ayrılırlar (Tablo 1) (6,35,36).

Tablo 1. Glutatyon-S-transferaz enziminin izoenzimleri ve fonksiyonları

İzoenzim	**Fonksiyonu**
GSTA α (alfa)	steroid izomerzasyonu, peroksidaz aktivitesine sahiptir(6,35).
GSTM μ (Mü)	oksidatif stres ve kanserden koruma, sigara dumanındaki karsinojenleri detoksifikasyonu (37)
GSTP Π (Pi)	nöral hücre apopitozu, α,β-doymamış aldehitlerin ve orgadik peroksitlerin detoksifikasyonu (38)
GSTT θ (teta)	Substrat: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) (6)
GSTO Omega	Ca kanallarını modüle ederek memeli hücrelerini apopitozdan korur (35)
GSTS σ (sigma)	
GSTK κ (kappa)	
GSTZ zeta	

Glutatyon-S-tarnsferazlar birçok endojen ve eksojen ligandı bağlayabilme yeteneğine sahiptir ve detoksifikasyon da rol önemli role sahiptir. Bu enzimler elektrofilik merkezli kimyasal bileşiklere glutatyon yapısındaki sülfür atomunun nükleofilik atağını katalizleyerek inaktif hale gelmelerini sağlar. Buna ek olarak, Glutatyon-S-transferazlar peroksidaz ve izomeraz aktivitesine ve Jun N-terminal kinazı inhibe edebilme yeteneğine sahiptirler. Bu durum hücreleri H_2O_2 tarafından indüklenen hücre ölümünden korur (6,35).

Birçok kimyasal karsinojen elektrofilik yapıdadır. Glutatyon-S-transferazlar ksenobiyotiklerin ve karsinojenlerin detoksifikasyonunda kritik rol oynamaktadır (35). Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu üç faz da oluşan reaksiyonlarla sağlanmaktadır. Faz I ve II reaksiyonların da, lipofilik ve apolar ksenobiyotiklerin çözünürlüğünü arttırılarak toksisiteleri azaltılır. Çözünürlükleri artan ksenobiyotiklerin hücre dışına atılmalarıda daha kolaylaşır. Faz I reaksiyonları, sitokrom P450 sistemi tarafından katalizlenmektedir. Faz II enzimleri, ksenobiyotiklerin glutatyon (GSH), UDP-glukronik asit ve glisin ile konjugasyonunu sağlayarak endojen çözünebilir substratlara dönüşümünü kataliz ederler. Ksenobiyotiklere GSH konjugasyonu GST enzimleri tarafından katalizlenir (Şekil 4).



Şekil 4. Enzimatik detoksifikasyon mekanizmasının safhaları (6)

Glutatyon-S-Transferaz izoenzimleri, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve dokuların oksidatif hasardan korunması için önemlidir. Bu enzimler, kemoterapötik ilaçlar, çevresel karsinojenler, endojen moleküller olmak üzere ksenobiyotiklerin geniş bir spektrumunu detoksifiye ederler (Tablo 2) (36).

Tablo 2. Glutatyon-S-Transferaz enzimlerinin substratları

Endojen Moleküller	**İlaçlar**	**Çevresel Karsinojenler**	**Pestisidler**
4-Hidroksi-2-nonenal	Cis-platin	Butadien	Lindan
Kolesterol-5,6-oksit	Klorambusil	Akrolein	Alaklor
Adenin propenal	Siklofosfamid	Aflatoksin B-8,9-epoksit	Atrazin
9-Hidroperoksi-linoleik asit	Tiyotepa	Hekzaklorobütadien	DDT
Dopaminokrom	Fosfomisin	Trikloroetilen	Metil paratiyon
Aminokrom	Etakrinik asit	Stiren oksit	
Katekol östrojen	Nitrogliserin	Metilen klorür	
Maleilasetoasetat	Menadiyon	Etilen oksit	
	Adriamisin	Nitrokuinolin oksit	
	Asetaminofen	7-Hidroksimetilbez-(a) antresen sülfat	
		5-Hidroksimetil-krizen sülfat	

Serbest oksidan radikalleri, antioksidan vitaminler, antioksidan enzimler ve faz II enzimlerinin memeli yumurtalıklarında bulunduğu bilinmektedir. Bu moleküllerin düzeyleri hormonal regülasyona bağlı olarak değişebilmektedir. Toksik bileşiklerin metabolize edilmesindeki rollerinin yanı sıra, bu enzimlerin bir çok izomeri folikülogenezis, ovulasyon ve olgunlaşma gibi normal yumurtalık fonksiyonlarında yer almaktadır (39). İnsan embriyonik dokusunda GST izoenzimlerinin analizi ile bu önemli detoksifikasyon enzimlerinin ekspresyonunun kavranmasına yardımcı olunabileceği ve hücreyi sitotoksik ajanlardan korumadaki rollerinin daha iyi anlaşılacağı iddia edilmektedir. Bazı ilaçlar ve kimyasallar plasentayı geçip fetal dokuda birikebilir. Bu durumda GST aracılıklı detoksifikasyon yolu önemli hale gelir (35).

2.2.3.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar, sentetik antioksidanlar ve diyetle alınan vitamin ve mineralleri kapsamaktadır (34). Metal bağlayan proteinler, diyetle alınan antioksidanlar ve diğer antioksidanlar şeklinde sınıflandırılan enzimatik olmayan antioksidanlar ve etki mekanizmaları Tablo 3' de belirtilmiştir.

Tablo 3. Enzimatik olmayan antioksidanlar ve etki mekanizmaları

Metal Bağlayıcı Proteinler

Antioksidan	**Etki Mekanizması**
Albumin	LDL oksidasyonunu, bakırı bağlayarak ya da bakır bağlanma yerini bloklayarak engeller (23).
Seruloplazmin	Ferro demiri ferri demire yükseltgeyerek Fenton reaksiyonu ile serbest radikal üretimini engeller. Plazma antioksidan kapasitesitesinin büyük bir bölümünden sorumludur (40).
Ferritin	Doku demirini bağlayarak oksidan etkisini kaldırır (23).
Transferin	Dolaşımdaki serbest demiri bağlar (26).
Laktoferrin	Dolaşımdaki serbest demiri bağlar (30).
Haptoglobulin	Yaşlı eritrositlerin parçalanmasından açığa çıkan demiri bağlar (26).
Hemoglobin	Demiri taşır (26).
Miyoglobin	Demiri depolar (26).

Diyetle Alınan Antioksidanlar

Antioksidan	**Etki mekaniması**
Vitamin C	Süperoksit ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek onları temizleyen güçlü bir indirgeyici aktiviteye sahip suda çözünen güçlü antioksidandır. Tokoferoksil radikalinin, alfa tokoferole indirgenmesini ve antiproteazların oksidan madde etkisiyle ile aktivitelerinin kaybolmasını engeller (26)
Tokoferoller	α-Tokoferol (Vit E), daha çok singlet oksijeni bastırabilme yeteneğine sahip lipofilik bir antioksidandır. Hücre membranlarının ve çeşitli lipidlerin (özellikle LDL'nin) lipid peroksidasyonunda zincir kırıcı olarak fonksiyon görür (41).
Karotenoidler	β-karoten, α-karoten, likopen, lutein, beta-kriptoksantin ve diğer yapısal benzer karotenoidler önemli antioksidanlardır. β-karoten, singlet oksijenin en güçlü bastırıcısı ve peroksil radikallerinin toplayıcısıdır (18,31).
Flavonoidler	Süperoksit, lipid alkoksil, peroksil, nitrik oksit radikallerini temizlerler. Vit E'nin rejenerasyonuna katılır (42).
Selenyum	Lipid peroksit ve hidroperoksitleri nötralize eden en önemli doğal endojen antioksidan olan glutatyon peroksidazın yapısında yer alır (43).
Bakır	Cu-ZnSOD enziminin yapısında bulunarak lipid peroksitlerin birikimini engeller (26,31).
Çinko	Sitoplazmik antioksidan olan Cu-ZnSOD yapısında yer alan çinko (Zn), bakır ve demir ile yarışır, ve böylece Fenton ve/veya Haber-Weis kimyası ile hidroksil radikali oluşumunu azaltır (44).
Taurin ve hipotaurin	Hücresel antioksidan metabolizmasında rol oynarlar. Hipotaurin hidroksil radikallerini toplayabilme ve lipid peroksidasyonunu inhibe etme kapasitelerine sahiptir (18).
Glutatyon	Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan ve proteinlerdeki –SH gruplarını oksidasyona karşı muhafaza eden çok önemli antioksidandır (43).

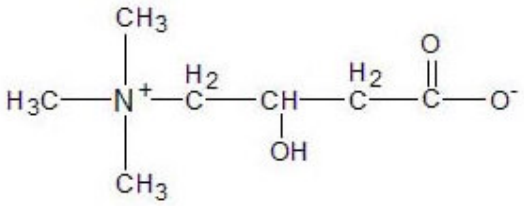
Diğer Antioksidanlar

Antioksidan	**Etki mekanizması**
Biluribin	Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır (26).
Dihidrolipoat	Hidroksil radikallerini toplar ve lipoat-dihidrolipoat kompleksi GSSG'yi GSH'a indirger (18).
Fibrinojen	Hidroksil radikali toplayıcısıdır (45).
Koenzim Q	Vit E'nin okside şeklini indirgeyen Koenzim Q, özellikle peroksidasyonla üretilen serbest radikalleri toplar. Selenyum ile sinerjik etki gösteren güçlü bir antioksidandır (46).
Nitrik oksit	Süperoksit radikali toplayarak süperoksidin sitotoksik etkisine bir bariyer oluşturmaktadır. NO miktarı, süperoksit miktarından çok fazla olduğu zaman fizyolojik etkisi görülmektedir (47).
Ürik asit	Lipid radikallerine etkisi olmayıp, hidroksil, süperoksit, peroksi radikallerini ve singlet oksijeni temizler (48).
Melatonin	Hidroksil radikalini, süperoksit radikalini tutan bir antioksidan olan indolil katyon radikaline dönüştürerek ortadan kaldıran lipofilik bir antioksidandır (26).
HDL	Metal şelasyonu ya da peroksidaz benzeri aktivite ile LDL'nin oksidasyonunu engeller. Süperoksit radikallerini toplar (49).
L-Karnitin	L-Karnitin ve bazı esterlerinin (asetil-L-karnitin) ksantin oksidazı kısmen inhibe ettiği ve buna bağlı olarak hipoksi-reoksijenasyon hasarını inhibe ettiği ifade edilmektedir (10).

2.2.3.2.1 L-Karnitin

Karnitin (γ-trimetilamino-β-hihsoksi bütirik asit) ilk olarak 1905' te kas dokusunda keşfedilmiştir. Karnitin küçük molekül ağırlıklı polar bir bileşiktir. D- ve L-formunda iki enantiyomeri mevcut olup, doğal formu ve biyolojik aktif şekli L-Karnitin'dir (50,51). Karnitin yapısında kuarter amin grubu mevcut olup uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye transportunda fonksiyon gösterir.(50,52) (Şekil 5). Bu metabolik fonksiyonunu, asetil ve diğer açil gruplarının tekrar tekrar karnitine eklenip ayrılmasıyla gösteririr.

L- Karnitin



Şekil 5. L-Karnitin Kimyasal Yapısı

L-Karnitin sentezi lizin ve metiyonin amino asitleri öncülüğünde karaciğer böbrek ve beyinde gerçekleşmektedir (53). L-Karnitin iskelet ve kalp kasında 3-5 μmol/g civarında muvcut iken karaciğer, böbrek ve beyindeki miktarının 0.5-1 μmol/g olduğu ifade edimektedir. L-Karnitinin kas dokusundaki miktarı plazma düzeyinin yaklaşık 100 katıdır. Kandaki düzeyi; endojen sentezine, diyetle alınımına ve idrarla atılımına bağlıdır. İdrarla atılımı plazma konsantrasyonu eşiğine ulaşıldığı zaman gerçekleşmektedir. L-Karnitin "şartlı esansiyel besin" olarak bilinmektedir. Biyolojik aktivitelerini üstlenecek başka bir molekül olmamasına rağmen esansiyel değildir (50).

L-Karnitin hem lipid metabolizmasını hem de karbohidrat metabolizmasını etkilemektedir. L-Karnitin yağ açil-KoA' lara bağlanarak β-oksidasyona uğramak üzerere mitokondri membranından geçişlerini düzenler. L-Karnitin eksikliği serbest yağ asitlerinin azalan oksidasyonuna ve uzun zincirli yağ açil-CoA' ların birikmesine yol açar. L-Karnitin' nin glukoz metabolimasındaki etkisi ise mitokondride yağ asidi oksidasyonunu stimule etmesi özelliğiyle ilgilidir. L-Karnitinin, piruvat dehidrogenaz aktivitesini ve glukoz oksidasyonunu uyararak mitokondri içindeki açilCoA/CoA oranını, düzenleyecektir (52).

2.2.3.2.1.1 L-Karnitin ve Antioksidan etkisi

L-Karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin β-oksidasyonu ile ATP üretimi için hayati önem taşıyan bir bileşiktir (54). L-Karnitinin fonksiyonu ile ilgili bir bozukluk yağ asitlerinin mitokondriye transportunu interfere eder, sitoplazmada serbest yağ asitleri mi birikir. Mitokondride yağ asitlerinin azalan düzeyleri β- oksidasyonu sınırlar ve daha az enerji oluşumuna yol açar. Karnitin desteği yağ asidi transportunu arttırarak ATP üretimini arttırabilir (55). L-Karnitin' in antioksidan etkisi olduğu öne sürülmektedir. L-Karnitin serbest radikal temizleyicisi (scavenger) rolü üstlenerek hücreleri ROS' den korumaktadır. Ratlarla yapılan çalışmalarda bileşik antioksidan etkisi gösterilmiştir (54).

L-Karnitin ve bazı esterlerinin (asetil-L-karnitin) ksantin oksidazı kısmen inhibe ettiği ve buna bağlı olarak hipoksi-reoksijenasyon hasarını inhibe ettiği ifade edilmektedir (56). Shug ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda asetil-L-karnitinin mitokondrial süperoksit anyon üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (9). Asetil-L-karnitin' in mitokondriyel fonksiyonu geliştirdiği ve yaşa bağlı etkileri geri döndürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca, karnitin ve karnitin türevlerinin enerji üretimine aracılık ederken direkt ya da indirekt olarak molekülleri oksidatif hasardan koruduğu ve hasarlı biyomoleküllerin tamirine ve aracılık edebileceği ifade edilmiştir (10). L-Karnitin'in bir şelatör olarak etki ederek lipid perokdidasyonunu indükleyen metal iyonlarının (Fe) miktarını azalttığı gösterilmiştir (57,58). Karnitin'in glutatyon miktarının arttırdığı söylenmektedir (59,60).

2.3 Tekrarlayan Düşükler ve Antioksidan-Oksidan Denge

Serbest radikallerin neden olduğu zarar, etiyolojik olarak gebeliğin fizyolojik, patalojik ve klinik komplikasyonları arasında yer almaktadır. Maseki ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, hamile bayanlarda hamile olmayanlara göre lipid peroksidaz değerlerinin arttığı ve total serum lipid değerlerini değiştirdiğini belirtilmiştir. Ayrıca pre-eklamptik bayanların, normal bayanlarla karşılaştırıldıklarında daha yüksek serum lipid peroksidaz aktivitesi gösterdikleri bulmuştur. Ratlarda, lipid peroksidasyonunun (vitamin E yokluğuyla indüklenen) normal gebelik sürecinde gerçekleşen değişikliklerden eikosanoid sentezini kontrol eden birkaç enzimin ekspresyonunu tersine çevirirdiği belirtilmektedir. Ayrıca, Wang ve arkadaşları. pre-eklampsideki prostasiklin ve tromboksanlar arasındaki dengesizliğin, lipid peroksidazlar ve vitamin E gibi antioksidan arasındaki dengesizlikle anlamlı bir şekilde bağlantılı olduğunu göstermişlerdir. Tromboksan ve protasiklinler arasındaki aynı dengesizlik tekrarlayan düşüklerde de gözlenmiştir. Sona ve arkadaşları tekrarlayan düşük görülen bayanlarda düşük gerçekleşmeden önce yüksek serum lipid peroksidaz değerleri bulmuşlar ve bu değerlerin düşükten sonra anlamlı düzeyde azaldığını belirlemişlerdir.

Gebelik ve antioksidan defans ile alakalı birkaç çalışma bulunmaktadır. Normal gebelikte artan serum antioksidan aktivitesi gözlenmiştir. Eritrositlerde Glutatyon peroksidaz aktivitesi artarken selenyum gibi düzeyleri azalır. Wisdom ve arkadaşları gebelikteki hipertansiyonu indüklediği eritrosit lizot tiyol düzeylerinin normatensif gebeliklere göre daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Hipertansiyonla beraber proteinüri ile indüklenen gebelikteki seruloplazmin düzeyleri, proteinürisiz hipertansiyonla indüklenen gebeliklerden daha yüksektir. Gebelik kayıplarında antioksidan aktivite de azalama gözlenmiştir (61).

3 MATERYAL ve METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	Marka / Model
Derin dondurucu	Vestel, Arçelik, Bosch
Saf su cihazı	Aquatron 4AD
ELISA yıkayıcısı	Diagnostics Pasteur LP 35
ELISA okuyucusu	Spektraflour plus, TECAN
ELISA pleyti	Coostar, yüksek bağlama kapasiteli
Etüv	Gallenkamp
İnkübatör	Nüve, SL 350
Hassas analitik terazi	Oertling NA 164
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Semi-otomatik pipet, ayarlanabilir hacimli	Biohit, Proline, Socorex, Transferpette, Exelpette
Sıcak su banyosu	Hanna Instruments, HI 9321
Santrifüj	Heraeus, Labofuge 200
Spektofotometre küveti	Philco FRT 152 D
Spektrofotometre	Beckman Coulter DU530, UV /VIS
Vorteks	Nüve, NM 110

3.1.2 Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Kimyasal Madde	Firma, Kodu ve Saflığı
Sülfürik asit (H_2SO_4)	Merck, K13883913, % 95-98
Fosfotugistik asit ($H_3(P(W_3O_{10})_4).x\ H_2O$)	Merck, B614682
TBA (2-tiyobarbitürik asit) ($C_4H_4N_2O_2S$)	Merck, L613080
Asetik asit (CH_3COOH)	Merck, K27574156, % 100
Perklorik asit ($HClO_4$)	Merck, B663319, % 70-72
Potasyum karbonat (K_2CO_3)	Merck, 104924

Çözelti	Hazırlanışı ve Kullanıldığı Yer
%10' luk Fosfotugistik asit ($H_3(W_3O_{10})_4.x\ H_2O$)	4g fosfotungistik asit, 36 mL saf suda çözüldü. MDA tayininde protein çöktürme işlemi için kullanıldı.
0,084 N Sülfürük asit (H_2SO_4)	570 µL H_2SO_4 % 98' lik orijinal şişeden alındı. İçinde bir miktar saf su bulunan 250 mL' lik balon jojeye pipetlendi ve hacim 250 mL' ye tamamlandı. MDA tayininde protein çöktürme işlemi için kullanıldı.
Tiyobarbitürik asit (TBA)	0,67 g TBA tartıldı. Bir miktar saf suda ısıtılarak manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldükten sonra hacim 100 mL' ye tamamlandı. Sonra 100 mL asetik asit ile karıştırıldı. Bu çözelti günlük hazırlandı. MDA tayininde kullanıldı.
0,6 M Perklorik asit ($HClO_4$)	13 mL $HClO_4$ % 70 – 72' lik orijinal şişeden alındı. İçinde bir miktar saf su bulunan 250 mL' lik balon jojeye pipetlendi ve hacim 250 mL' ye tamamlandı. L-Karnitin tayininde örnek hazırlanışı için kullanıldı.
1,2 M Potasyum Karbonat (K_2CO_3)	16,5 g K_2CO_3 100 mL saf suda çözüldü. L-Karnitin tayininde örnek hazırlanışı için kullanıldı.

3.2 Metodlar

3.2.1 Deneyin Planlanması ve Örneklerin Toplanması

Bu çalışma KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalları tarafından ortak olarak yürütülmek üzere planlandı.

Hasta grubu, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğinde tekrarlayan gebelik kaybı teşhisi koyulan 46 bayandan oluşturuldu. Gebeliğin 20. haftasından önce iki veya daha fazla sayıda düşük yapmış ve birden fazla yaşayan çocuğu olmayan hastalar tekrarlayan gebelik kaybı grubu olarak ifade edildi.

Kontrol grubu ise yaşları hasta grubu uyumlu, tekrarlayan gebelik kaybı hikayesi olmayan ve sağlıklı doğum yapmış 46 bayandan oluşturuldu.

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin brakial veninden alınan kan örnekleri antikoagülanlı (1mg/mL EDTA) ve antikoagülansız vakutainer tüplere aktarıldı. Antikoagulansız tüpteki kan örnekleri oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletilerek pıtılaşması sağlandı. Her iki kan örneği 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek serum ve plazmalar elde edildi. Serum ve plazma örneklerinden yeterli sayıda aluguot hazırlanarak analiz edilinceye kadar –80 ^{0}C' de saklandı.

Glutatyon-S-transferaz aktivitesi ve MDA miktar tayini için plazma, total oksidan durum, total antioksidan kapasite ve L-Karnitin analizleri için ise serum örnekleri kullanıldı.

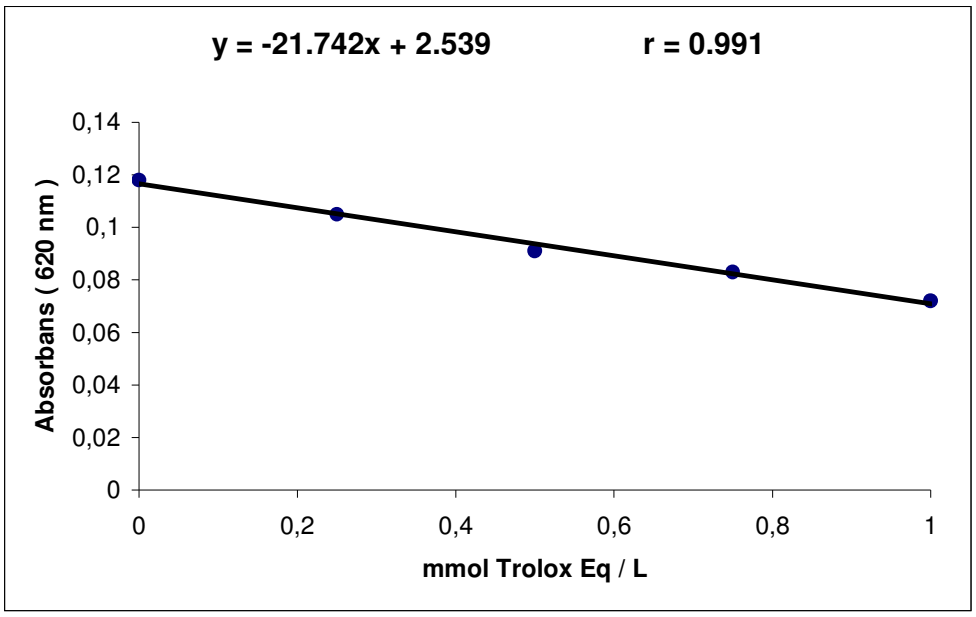
3.2.2 Total Antioksidan Kapasite Tayini

Hasta ve kontrol grubuna ait serum örneklerinde total antioksidan kapasite tayinleri Özcan EREL tarafından geliştirilen metod kullanılarak yapıldı (62). Bu metoda göre; radikal katyon oarak kullanılan $ABTS^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis-3-etilbenzatiyozolin-6-sülfonik asit) konsantrasyon ve antioksidan kapasitesiyle orantılı olarak antioksidanlar tarafından renksizleştirilir. Renkteki bu değişim 620 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülür ve total antioksidan kapasite olarak ifade edilir.

Kalibratör olarak Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkrom-2-karboksilik asit) kullanıldı. Sonuçlar litredeki mmol trolox ekivalenti (mmol Trolox Eq./L) olarak tarif edildi.

Deneyin Yapılışı :

1. Deneyler için elisa pleytleri kullanıldı ve kuyucuklarına 5' şer µL standart (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mmol Eq. /L), kontrol ve hasta örnekleri pipetlendi. Her bir örnek için çift kuyucuk kullanıldı.
2. Her bir kuyucuğa 200 µL Reaktif 1 (0.4 mol/L asetat tamponu pH: 5.8) pipetlendi.
3. Elisa okuyucusunda 620 nm dalga boyunda bütün örneklerin kör absorbans okuması yapıldı.
4. Her bir kuyucuğa 20 µL Reaktif 2 (pH: 3.60, 30 mmol/L asetat tamponu içerisinde $ABTS^{\cdot+}$) pipetlendi.
5. 3-4 dakikalık inkübasyon sonrasında 620 nm dalga boyunda absorbanslar yeniden okundu.
6. Okunan absorbans değerlerinden okunan kör değerleri çıkarıldı.
7. Elde edilen absorbanslar kullanılarak standart grafiği hazırlandı ve bu grafikten yararlanılarak bütün örneklerdeki total antioksidan kapasite miktarı mmol Trolox Eq /L cinsinden belirlendi (Şekil 6).



Şekil 6. Total antioksidan durum tayini standart grafiği

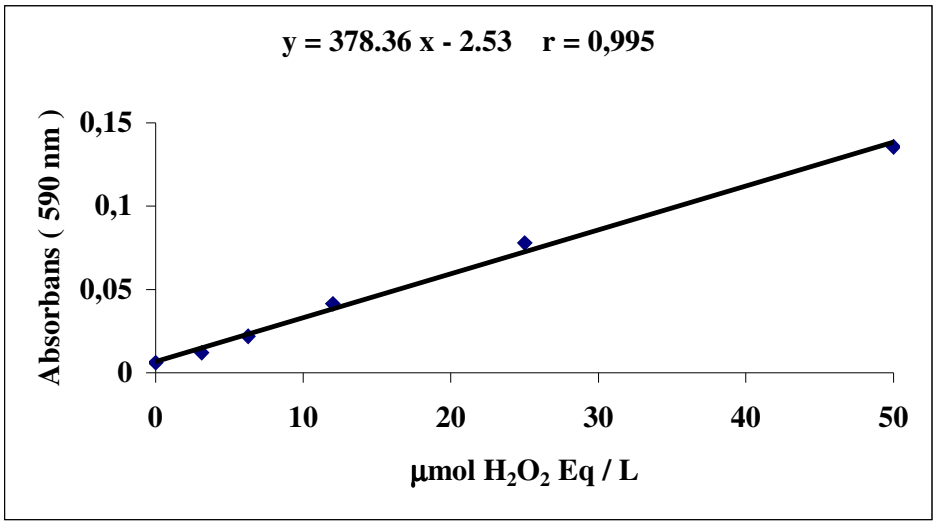
3.2.3 Total Oksidan Durum Tayini

Hasta ve kontrol gruplarındaki serum örneklerinde total oksidan durum tayini Özcan EREL (2005) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı (63). Bu metoda göre; örneklerdeki oksidanlar varlığında Fe^{2+} iyonu-*0*-dianisidin kompleksi oksidasyona uğradığında Fe^{3+} iyonu oluşur. Oksidasyon reaksiyonu gliserol molekülleri tarafından arttırılır. Fe^{3+} iyonu asidik ortamda Ksilenol turuncusu ile renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan rengin şiddeti 590 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenir ve bu örnekteki total oksidan molekül miktarı olarak ifade edilir.

Kalibratör olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanıldı. Sonuçlar litredeki mikromol hidrojen peroksit ekivalenti (μmol H_2O_2 Eqiv./L) olarak verildi.

Deneyin Yapılışı :

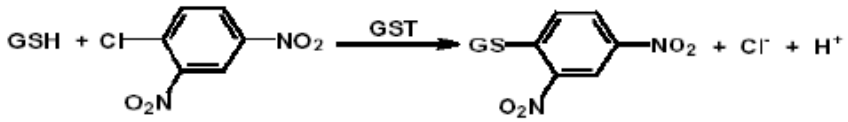
1. Deneyler için elisa pleytleri kullanıldı ve kuyucuklarına sırasıyla 35' er µL standartlar (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µmol H_2O_2 Eq / L), kontrol ve hasta örneklerileri pipetlendi. Her bir örnek için çift kuyucuk kullanıldı.
2. Her bir kuyucuğa 225 µL Reaktif 1 (pH:1.75, 25 mM H_2SO_4 çözeltisi içerisinde 150 µM ksilenol turuncusu, 140 mM NaCl ve 1.35 M gliserol) pipetlendi.
3. Elisa okuyucusunda 590 nm dalga boyunda bütün örneklerin kör absorbans okuması yapıldı.
4. Her bir kuyucuğa 11 µL Reaktif 2 (25 mM H_2SO_4 çözeltisi içerisinde 5 mM Fe^{+2} iyonu ve 10 mM *o*-dianisidin) pipetlendi.
5. 3-4 dakikalık bir inkübasyon sonrasında her örnekte 590 nm dalga boyunda absorbans okuması yapıldı.
6. Okunan absorbans değerlerinden okunan kör değerleri çıkarıldı.
7. Absorbans değerleri kullanılarak standart grafiği hazırlandı ve bu grafik yardımıyla her örnekteki total oksidan miktarı µmol H_2O_2 Eq /L olarak hesaplandı (Şekil 7).



Şekil 7. Total oksidan durum tayini standart grafiği

3.2.4 Glutatyon-S-Transferaz (GST) Aktivitesi Tayini

Plazma örneklerinde Glutatyon-S-transferaz aktivitesi tayinleri kolorometrik ölçüm yönteminegöre çalışan ticari kitler kullanılarak yapıldı (BioVision USA, Cat. No: K263-100). Bu metoda göre, Glutatyon-S-transferaz (GST) enzimi tarafından katalizlenen glutatyon ve GST substratı arasındaki reaksiyona dayanmaktadır. Glutatyon-S-transferaz substaratı olarak, bu enzim ailesinin genel substratı olan CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen) kullanıldı. Normal koşullarda, GSH ile CDNB arasındaki etkileşim GST aktivitesine bağlıdır ve bu etkileşiminin ürünü olarak dinitrofenil tiyoeter oluşur. Bu bileşik, 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenir (Şekil 8).



Glutatyon CDNB Dinitrofenil tiyoeter

Şekil 8. Glutatyon-S-transferaz aktivitesi tayininin esasını oluşturan reaksiyon.

Deneyin Yapılışı :

1. Bütün örnekler GST Örnek Tamponu ile son hacim 100 µL olacak şekilde dilüe edildi (Negatif kontrol: 100 µL GST Örnek Tamponu, Pozitif kontrol: 2 µL GST + 98 µL GST Örnek Tamponu, Hasta ve kontrol grubu örnekleri: 75 µL serum + 25 µL GST Örnek Tamponu).
2. Standartlar da dahil her örnek için 10 µL CDNB + 90 µL GST Assay Tamponu içeren substrat karışımı hazırlandı ve iyice karıştırıldı.
3. GST aktivitesinin tayini için elisa pleytleri kullanıldı ve her bir kuyucuğa 10 µL GSH eklendi.
4. Her bir kuyucuğa 100 µL substrat karışımı eklendi ve pleytler dikkatli bir şekilde çalkalandı.

5. Elisa okuyucusunda 340 nm dalga boyunda birer dakika arayla 5 kez absorbans okuması yapıldı.
6. Örneklerdeki GST aktivitesi kit prospektüsünde verilen formüller kullanılarak hesaplandı.

Sonuçların Hesaplanması :

$$\Delta A_{340/dakika} = \frac{A340\ (Zaman\ 2) - A340\ (Zaman\ 1)}{Zaman\ 2\ (dk) - zaman\ 1\ (dk)}$$

$$GST\ Aktivitesi = \frac{\Delta A340/min}{0.00503\ \mu M\text{-}1} \times \frac{0.2\ ml}{A} \times örnek\ dilüsyonu = nmol/dk/mL$$

A : Her bir kuyucuktaki örnek hacmi (mL)

0.00503 μM-1 : Ekstinksiyon faktör

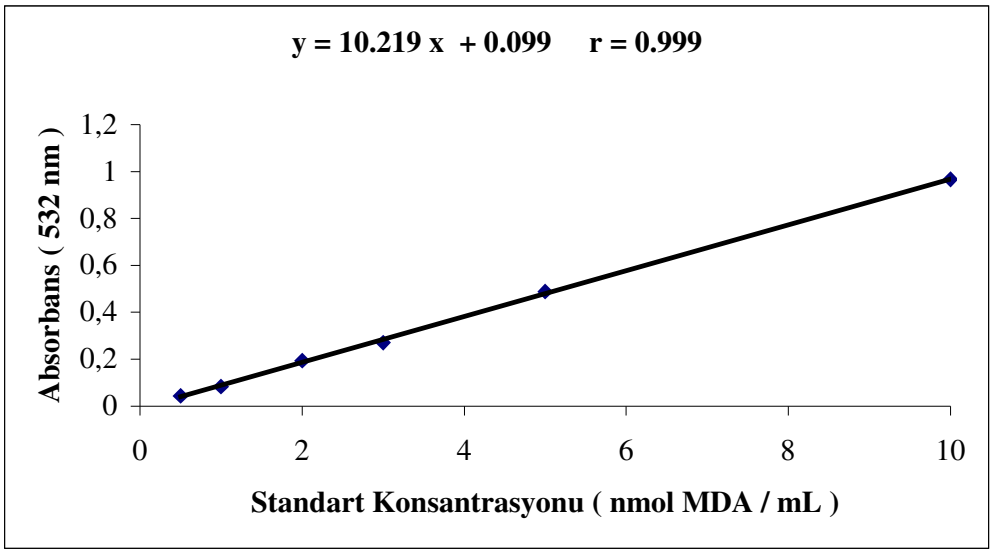
Örnek dilüsyonu : 3/2

3.2.5 Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi

Plazma örneklerinde malondialdehit miktarı Yagi (1984) tarafından geliştirilen TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) methodu kullanılarak tayin edildi (64). Lipid peroksidasyon ürünü (MDA) ile tiyobrbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tiyobarbitürikasit ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri uzaklaştırmak için serum lipidleri proteinle birlikte fosfotungistik asit/sülfirik asit sistemiyle çöktürüldü.

Deneyin yapılışı :

1. Bir deney tüpüne 150 µL plazma, 1.2 mL H_2SO_4 ve 150 mL fosfotungistik asit eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika bekletildi.
2. Karışım 1500 g' de 10 dk. santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
3. Geriye kalan çöekelek üzerine 2 mL saf su eklendi ve yeniden çözününceye kadar vortekslendi.
4. Tüpe 500 µL TBA eklendi ve 1 saat 100 ^{0}C' de inkübe edildi.
5. İnkübasyonun ardından tüpler 1000 g' de 10 dk. santrifüjlendi.
6. Üstteki berrak kısım alınarak 532 nm dalga boyunda absorbanslar okundu.
7. 1 mmol 1,1,3,3-tetrametoksipropan 100 mL 0.01 M HCl içinde 50 ^{o}C' de 1 saat inkübe edildi ve bu bileşiğin hidrolizi sonucu oluşan MDA çözeltisinden 10, 5, 3,2,1, 0.5 nmol/mL çalışma standartları hazırlandı. Elde edilen sonuçlarla standart grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak plazma MDA miktarı nmol MDA/mL olarak belirlendi (Şekil 9)



Şekil 9. MDA Standart Grafiği

3.2.6 L-Karnitin Tayini

L-Karnitin tayini için Roche Diagnostics tarafından üretilen ticari kitler kullanıldı (Roche Diagnosties, USA, Cat.No 11 242 008 001). L-Karnitin, aşağıda gösterilen bir dizi reaksiyon ile L-laktat' a dönüşür:

$$\text{L-Karnitin + Asetil CoA} \xrightarrow{\text{Asetil transferaz (CAT)}} \text{Asetil karnitin + CoA}$$

$$\text{CoA + ATP + Asetat} \xrightarrow{\text{Asetil CoA Sentetaz (ACS)}} \text{Asetil CoA + AMP + } PP_i$$

$$\text{AMP + ATP} \xrightarrow{\text{Miyokinaz (MK)}} \text{2 ADP}$$

$$\text{2 ADP + 2 PEP} \xrightarrow{\text{Piruvat Kinaz (PK)}} \text{2 ATP + 2 Piruvat}$$

$$\text{2 Piruvat + 2 NADH} \xrightarrow{\text{Laktat Dehidrogenaz (LDH)}} \text{2 L-Laktat + 2 } NAD^+$$

Son reaksiyonda harcanan NADH miktarı 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak takip edilebilir ve bu miktar L-Karnitin miktarı ile ilişkilidir.

Deneyin Yapılışı :

A- Serum Örneklerinin Hazırlanışı ;

1. 10 mL'lik santrifüj tüpüne 1 mL 0.6 M perklorik asit çözeltisi ve 1 mL serum pipetlendi. Bu karışım iyice vortekslendikten sonra buz banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyon süresi bitiminde tüpler 3000 g' de 10 dakika santrifüj edildi.
3. Tüpteki süpernatan kısmından 1 mL alınarak yeni bir deney tüpüne aktarıldı. Üzerine 200 µL 1.2 M potasyum karbonat çözeltisi eklendi ve iyice vortekslendikten sonra buz banyosunda 20 dakika inkübe edildi.

4. İnkübasyonu takiben tüpler 3000 g' de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatan yeni bir deney tüpüne aktarıldı.

B- Deney Protokolü;

1. Aşağıdaki tablodaki sıraya göre kimyasallar küvetlere pipetlendi.

Reaktif	Kör	Örnek	Standart
Çözelti 1	1 mL	1 mL	1 mL
Örnek (Serum)	-	500 µL	-
Standart Çözeltisi	-	-	100 µL
Çözelti 2	100 µL	100 µL	100 µL
Saf Su	1.1 mL	600 µL	1 mL

Çözelti 1 : PH 7.0 Tris tamponu, 6 mg astil-koenzim A, 4 mg PEP, 3 mg magnezyum asetat 5 mg NADH ve ATP içeren liyofilize kimyasala 10 mL saf su 1 mL deterjan eklenerek karıştırıldı. Bu çözelti kullanılmadan 10 dakika önce hazırlandı.

Standart çözelti : 100 mg/L

Süspansiyon 2 : 2 U astil-CoA sentetaz, 160 U miyokinaz, 240 U laktat dehidrogenaz, 240 U piruvat kinaz içeren enzim süspansiyonu

Süspansiyon 3 : 60 U asetil transferaz içeren enzim süspansiyonu

2. Parafilm yardımıyla küvetler alt üst edilerek karışımları sağlandı ve 10 dakika sonra 340 nm' de absorbansları okundu (A_1).
3. 5 µL Süspansiyon 3 eklenerek reaksiyon başlatıldı ve parafilm yardımıyla küvetler alt üst edilerek karışımları sağlandı.
4. 30 dakika inkübasyondan sonra 340 nm' de absorbanslar okundu (A_2).
5. Bunu takiben 10 dakika sonra 340 nm' de absorbanslar tekrar okundu (A_3).
6. Elde edilen değerler ve kit prospektüsünde belirtilen formüller kullanılarak örneklerdeki L-Karnitin miktarı mg/L cinsinden hesaplandı.

Sonuçların Hesaplanması :

Absorbans farkları aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

Kör Absorbans farkı = $(A_1 - A_2)_{kör} - 3 \times (A_2 - A_3)_{kör} = (\Delta A_{kör})$

Örnek Absorbans farkı = $(A_1 - A_2)_{örnek} - 3 \times (A_2 - A_3)_{örnek} = (\Delta A_{örnek})$

$$\text{L-Karnitin konsatrasyonu (mg/L) (C)} = \frac{V \times MW \times F}{\varepsilon \times d \times v \times 2} \times \Delta A \text{ (mg/L)}$$

$$C = \frac{2.205 \times 161.2 \times 2.34}{6.3 \times 1 \times 0.5 \times 2} \times \Delta A$$

$C = 132 \times \Delta A$ (mg L-karnitin /L)

V = son hacim (mL)

v = örnek hacmi (mL)

MW = ölçülecek olan maddenin molekül ağırlığı (g/mol)

d = yol uzunluğu (cm)

ε = molar absorbsiyon katsayısı (340 nm' de NADH için = 6.3 ($L \times mmol^{-1} \times cm^{-1}$))

F = seyreltme faktörü (F = 2.34)

Hesaplanan Standart Sonuçları :

Tablo 4. Hesaplanan L- Karnitin standart sonuçları.

Standart Konsantrasyonu (mg/L)	Hesaplanan Standart Konsantrasyonu (mg/L)
3,125	3,82
6,25	6,46
12,5	12,94
25	25,74
50	57,69
100	108,12

3.3 İstatistiksel Analizler

Kontrol ve hasta grubundan elde edilen değerler aritmetik ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi (X±SD). Her iki gruptaki parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Simirnov testi ile değerlendirildi. Ortalamalar arasındaki farkın önemliliğini analiz etmek için normal dağılıma uyanlarda Student-t testi, uymayanlarda ise Mann Whitney U testi kullanıldı. $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4 BULGULAR

Tekrarlayan düşük görülen hastalar ve kontrol grubunu oluşturan bayanlara ait demografik veriler tablo 5' de gösterilmiştir.

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan şahıslardan elde edilen bazı kan antioksidan-oksidan denge parametre değerleri ise tablo 6' de verilmiştir.

Tablo 5. Tekrarlayan düşük görülen hastalar ve sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubuna ait demografik veriler.

	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	p
n	46	46	
Yaş	30 ± 5	31±5	0.108
Gebelik sayısı	3.2 ± 1.2	2.6 ± 1.3	0.052
Düşük sayısı	3.1 ± 1.1[a]	0.0 ± 0.0	0.001
Yaşayan çocuk sayısı	0.07 ± 0.3[a]	2.6 ± 1.3	0.001

a : $p<0.05$, kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı, Student-T test

Yaş ve gebelik sayıları yönünden her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmez iken ($p>0.05$), düşük sayısı ve yaşayan çocuk sayısı yönünden anlamlı fark vardı ($p<0.05$).

Tablo 6. Tekrarlayan düşük görülen hastalar ve sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubunda ölçülen bazı oksidan-antioksidan denge parametreleri.

	Hasta Grubu (n = 46) X±SD	Kontrol Grubu (n = 46) X±SD	p
Total Oksidan Durum (μmol H_2O_2 Eq/L)	18, 46 ± 6,66[a]	14, 93 ± 4,38	0,007
MDA (nmol/mL)	2,41 ± 1,45[b]	1,47 ± 1,11	0,0001
Total Antioksidan Kapasite (mmol Trolox Eq/L)	1,57 ± 0,14	1,59 ± 0,08	0,260
Glutatyon-S-Transferaz aktivitesi (nmol/dk/mL)	14,70 ± 4,69[c]	16,69 ± 4,64	0,044
L-Karnitin (mg/L)	6,88 ± 1,80[c]	7,68 ± 1,96	0,035

a : $p<0,05$ kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı, Mann Whitney U testi

b : $p<0,001$ kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı, Mann Whitney U testi

c : $p<0,05$ kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı, Student-T testi

Tekrarlayan düşük tanısı alan bayanlarda serum total oksidan durum değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Buna paralel olarak plazma MDA seviyeleri de hastalarda anlamlı kontrol grubundakilerden olarak daha yüksek bulundu ($p<0,001$).

Serum total antioksidan kapasiteler yönünden hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Hasta grubunda, ölçülen kan Glutatyon-S-Transferaz ve L-Karnitin seviyeleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunmuştur (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,05$).

5 TARTIŞMA

Tekrarlayan düşükler iki veya daha fazla düşüğün 20. gebelik haftasından önce spontan olarak meydana gelmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Spontan düşükler gebeliğin en yaygın komplikasyonlarından biridir. Tekrarlayan gebelik kayıpları, obstetrikte etyolojik ve prognostik faktör tayininde en yetersiz kalınan konulardan biridir. Tekrarlayan düşüklerin %68'inde neden idiyopatiktir. Tekrarlayan gebelik kayıplarının etyolojisinderol oynayan faktörler arasında kromozomal bozukluklar, uterus patolojileri, protrombotik durum, endokrin bozukluklar, immünolojik faktörler, servikal yetersizlikler, enfeksiyonlar, nütrisyonel ve çevresel faktörler, maternal hastalıklar, spermdeki yapısal ve fonksiyonel değişiklikler yeralmaktadır (65).

Sağlıklı bir vücutta, serbest radikaller ile antioksidanlar arasında bir denge vardır. Bu denge oksidan etki yönünde bozulursa oksidatif stres oluşur. Reaktif oksijen türlerindeki artış, dişi üretiminde görülen patalojilerde önemli bir role sahiptir. Reaktif oksijen türleri, döllenme için oosit olgunlaşması, embriyo gelişimi ve hamilelik gibi fizyolojik prosesleri etkilemektedir. Bu nedenle Alzeimer hastalığı, aterosklerosis, AIDS, Diabetus mellitus, romatoid artirit ve kanser gibi bir çok hastalığın etiyolojisinde yer alan oksidan-antioksidan dengedeki bozukluğun tekrarlayan gebelik kayıplarının da etiyolojisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (5).

Çalışmamızda tekrarlayan gebelik kayıplarında kan oksidan-antioksidan denge durumunu tespit edebilmek için serum total oksidan durum, MDA ve serum total antioksidan kapasite tayinleri yapıldı. Hasta grubu serum total oksidan durum düzeyi 18, 46 ± 6,66 μmol H_2O_2 Eq/L ve MDA mikatrı ise 2,41 ± 1,447 nmol/mL olarak bulundu. Bulunan bu değerlerin normal doğum yapmış sağlıklı kişilerden oluşturulan kontrol gurubu değerlerinden (sırasıyla 14, 93 ± 4,38 μmol H_2O_2 Eq/L ve 1,468 ± 1,115 nmol/mL) istatistiki olarak yüksek olsuğu tespit edildi (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.001$). Total antioksidan durum için refarans aralığı 5,54 – 21,38 μmol H_2O_2 Eq/L olarak ifade edilmiştir (63). Bu sonuçlara göre tekrarlayan gebelik kaybı görülen bayanların belirgin bir şekilde oksidatif strese mağruz kaldığı gözlenmektedir. Tekrarlayan gebelik kayıplarında etiyopatogenezin hala net olarak açıklanamadığı göz önüne alındığında elde ettiğimiz bu sonuç ilgi çekicidir.

Naziroğlu ve arkadaşları tekrarlayan düşük görülen bayanların lipid peroksidaz düzeylerini sağlıklı kişlerden oluşan kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (65). Bir başka çalışmada, Sane ve arkadaşları düşükten önce yüksek miktarda oksidatif stres oluştuğunu, düşükten önceki serum lipid peroksidaz düzeylerinin düşükten sonraya göre oldukça yüksek olduğunu belirtmektedirler (66).

Total antioksidan durum, vücudun çeşitli dokularında gerçekleşen serbest radikal atakları için fizyolojik bir bariyer olarak bilinmektedir. Gebelik sırasında antioksidan kapasiteni arttığı belirtilmektedir (61).

Bu çalışmada tekrarlayan gebelik kaybı görülen bayanlarda kan total antioksidan kapasite değeri 1,57 ± 0,14 olarak, kontrol grubu değerleri ise 1,59 ± 0,083 mmol Trolox Eq/L olarak belirlendi. Hasta ve kontrol grubu değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlenmektedir. Buna göre tekrarlayan düşük olgularında kan total antioksidan kapasitede anlamlı bir değişme olmadığı görülmektedir ($p>0.05$). Total antioksidan kapasite için referans aralığı 1,49 – 1,97 mmol Trolox Eq / L olarak belirtilmiştir (62).

Naziroğlu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada tekrarlayan gebelik kaybı teşhisi konulan bayanların plazma vitamin A, E ve β-karoten miktarlarını sağlıklı bayanlardan oluşan kontrol gurubuna kıyasla anlamlı olarak düşük olduğunu ifade edilmektedir (65).

Glutatyon-S-transferazlar dimerik yapıda bütün dokularda aktiviteye sahip olan birçoğu sitozolde, bazıları ise hücre membranına bağlı olarak bulunan bir enzim ailesidir. Glutatyon-S-transferaz izoenzimleri GSTM, GSTP, GSTT, GSTS, GSTA, GSTO, GSTK ve GSTK olarak belirtilmektedir (6). Glutatyon-S-transferaz enzim ailesi karsinojenlerin, antitümör ilaçların, çevresel kirliliklerin ve oksidatif stres ürünlerinin detoksifikasyonunda önemli role sahiptirler (67). Glutatyon-S-transferazlar endojen antioksidan detoksifikasyon enzimleridir. Glutatyon-S-transferazların hücrenin toksisite ve oksidatif stres ile mücadelesinde önemli bir role sahip olduğu vurgulanmaktadır (68). Glutayon-S-transferaz enzimlerinin aktivitesinin fetusun toksik maddelerden korunmasında önemli olduğu ifade edilmektedir (35). Ayrıca Glutatyon-S-transfaraz enzimlerinin antioksidan etkisi de gebelikte oksidan-antioksidan dengenin korunmasında küçükte olsa bir paya sahiptir (37).

Yaptığımız çalışmada tekrarlayan düşük görülen bayanlarda plazma GST aktivitesi değeri 14,70 ± 4,69 ve kontrol grubundaki plazma GST aktivitesi ise 16,69 ± 4,64 nmol/dk/mL olarak belirlendi. Hasta grubu GST aktiviteleri kontrol gurubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$). Bu sonuçlara göre, Glutatyon-S-transferaz enzimleri karsinojenlerin, ksenobiyotiklerin ve oksidan moleküllerin detoksifikasyonunda önemli role sahiptir. Bazı ilaçlar ve kimyasallar rahatlıkla plasentayı geçebilir. Bu durum Glutatyon-S-transferaz enzimlerinin hamile bayanlardaki önemini ortaya çıkarmaktadır (37). Bu nedenle tekrarlayan düşük yapan bayanlarda kan GST aktivitelerinin sağlıklı doğum yapan bayanlara göre düşük bulunması önem arzedebilir ve doku GST aktivitelerinin bir göstergesi olabilir. Tekrarlayan gebelik kaybı görülen bayanlarda GST aktivitesinin düşük bulunması detoksifikasyon mekanizmalarındaki aksaklıkları işaret edebilir. Bu aksaklıklar oksidatif stresin artmasına ve tekrarlayan gebelik kayıplarına yol açan olayları tetikleyebilir.

Rajimakers ve arkadaşları doğumdan hemen sonra aldıkları 6 plasenta örneğinde GSTA1+A2, GSTP1, GSTM1 ve GSTT1 izoenzimlerinin miktarlarını sırasıyla 107-276, 354-7113, 0-131 ve 407-1288 ng/mg olarak belirlemişlerdir ve GST enzim aktivitesini de 102-289 nmol/dak.mg protein olarak ölçmüşlerdir. Detoksifikasyonunda rol alan ve oksidatif stres ile miktarının arttığı bilinen GST izoenzimlerinin plasentada bulunma sebebinin plasentayı toksik maddelerden ve oksidatif stresten korumak olabileceğini ifade etmişlerdir (38).

Tekrarlayan gebelik kaybı hastalarında yapılan çalışmada GSTM1 genotip null polimorfizmi ile tekrarlayan düşükler arasında bağlantı olduğu ifade edilmektedir (4). Çeşitli milletler üzerinde yapılan çalışmalarda tekrarlayan gebelik kayıpları hastaları ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında Glutatyon-S-transferaz izoenzimlerinin polimorfizminin (GSTM1 null genotip, GSTP1 null genotip ve GSTT1) tekrarlayan gebelik kaybı görülen bayanlarda yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda gebelik sırasında maruz kalınan kafein alımı, sigara ve çevresel veya mesleki çeşitli kimyasallar gibi çevresel faktörlerin detoksifikasyonundaki aksaklığın düşüklere neden olabileceği düşünülmektedir (37). Glutatyon-S-transferaz aktivite tayininde bulduğumuz sonuçlar literatürlerdeki bilgileri desteklemektedir.

L- Karnitin (γ-trimetilamino-β-hihsoksi bütirik asit) küçük molekül ağırlıklı polar bir tetraamindir (7). L-Karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri memranından mitokondri içine aktarılarak β-oksidasyona uğramalarına öncülük eder. Bu durum, enerji sağlamak için yağ asitleri ve piruvatı kullanan kas dokuları için L-karnitinin önemini arttırır (69). L- Karnitin karaciğer, beyin, böbrek, iskelet ve kalp kas dokusunda oldukça yüksek miktarda bulunarak bu dokulardaki enerji gereksimine aracılık ederken dolaylı da olsa hücreyi oksidatif hasardan koruyarak antioksidan etki gösterdiği savunulmaktadır (70). Son yıllarda L-Karnitin molekülünün antioksidan etkisinin varlığına yönelik araştırmaların sayısında artış görülmektedir. Tekrarlayan gebelik kayıplarında L-Karnitin miktarını belirleyen çalışma olmaması nedeniyle yaptığımız çalışmanın özel bir önemi vardır.

Hasta grubunda serum L-Karnitin miktarını 6,88 ± 1,80 mg/L, kontrol grubu değerlerini ise 7,68 ± 1,96 mg/L olarak tespit ettik. Bu değerlere göre tekrarlayan düşük yapan bayanlarda kan L-Karnitin seviyelerinin kontrol grubundaki değerlerdekinden anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Roche ticari kitinde serum için L-Karnitin referans değeri 6,9 mg / L olarak belirtilmiştir.

Hücrelerde enerji üretim süreçlerinde hayati rolü olan ve antioksidan etkisinin varlığı vurgulanan L-Karnitin seviyelerinin tekrarlayan düşük yapan bayanlarda anlamlı olarak düşük bulunması ilgi çekici bir bulgu olabilir. Çünkü bu hastalarda kan GST aktiviteleri L-Karnitin' e benzer şekilde düşük bulunmuştur.

L-Karnitin, doğal olarak oluşan uzun zincirli yağ asilerinin mitokondriye geçişini sağlayan bir bileşiktir. Bazı gruplar karnitinin ve açil esterlerinin antioksidan ajan olarak rol oynayabileceğini öne sürmektedirler. Kabaoğlu ve arkadaşları hipoksi / reoksijenasyon indüklü intestinal hasarı olan farelere L-arginin ve L-karnitin tedavisi uyguladıklarında L-Karnitin tedavisi alan farelerin MDA düzeylerini L-arginin tedavisi alan farelere göre anlamlı olarak düşük bulmuşlardır (10). Bazı çalışmalarda L-Karnitinin ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ettiği belirtilmektedir (56). Shug ve arkadaşları asetil-L-karnitinin mitokondriyal süperoksit anyon üretimini inhibe ettiğini belirtmektedirler (9). L-Karnitin şelatör olarak etki edip lipid peroksidasyonunu indükleyen demir miktarını azalttığı gösterilmiştir (57,58). Ayrıca L-Karnitinin glutatyon miktarını arttırdığı ifade edilmektedir (59,60).

L-Karnitin anaroksiya, diyabet, siroz, miyokard infaktüs, hipertiroid, kısırlık ve böbrek yetmezliği gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (71). Tekrarlayan gebelik kayıplarında L-Karnitin ile ilgili çalışmaların çoğalması ile tedavisinde L-Karnitinin kullanılabilirliği incelenebilir.

Tekrarlayan gebelik kaybı grubu ile kontrol grubu arasında total antioksidan kapasite değerlerinde anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen tekrarlayan gebelik kaybı görülen bayanlarda kan Glutatyon-S-transferaz ve L-Karnitin seviyelerinde anlamlı bir düşüş olduğunu belirledik. Bu bulgularımız bir tezat gibi algılanabilir. Ancak Glutatyon-S-transferaz ve L-Karnitin yerleşimlerinin hücre içinde bulunması nedeniyle kan total antioksidan kapasitesine önemli katkılarının olabileceğini zaten beklemiyorduk. Ancak, Glutatyon-S-transferaz ve L-Karnitin seviyelerinin kontrol grubundan daha düşük bulunması hücrelerde öncelikle detoksifikasyon ve enerji üretiminin düzenlenmesi başta olmak üzere antioksidan savunmanın azalmış olabileceği ihtimaline işaret etmektedir. Bu durum tekrarlayan gebelik kayıplarının nedenlerini açıklığa kavuşturulmasında katkı sahibi olabilir.

Sonuç olarak tekrarlayan düşük olgularında oksidan-antioksidan dengenin oksidanlar yönünde bozulduğu görülmektedir. Bu hastalarda kan total antioksidan kapasite miktarının normal doğum yapan sağlıklı bayanlardan farklı bulunmamasına rağmen GST ve L-Karnitin miktarlarının anlamlı olarak düşük bulunması oksidan-antioksidan denge bozukluğunun düşük etiyolojisi mekanizmalarını açıklamada önemli olabileceği düşünülmektedir.

6 SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuçlar

1. Tekrarlayan gebelik kaybı görülen hastalarda kan total oksidan durum ve MDA seviyeleri 18, 46 ± 6,66 (ortalama±SD) μmol H_2O_2 Eq/L ve 2,41 ± 1,45 nmol/mL, sağlıklı doğum yapan bayanlardan oluşan kontrol grubunda ise sırasıyla 14, 93 ± 4,38 μmol H_2O_2 Eq/L bulundu ve hasta gurubu değerlerinin kontrol grubu geğerlerine göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0,05$ ve $p<0,001$).
2. Hasta grubu total antioksidan durum düzeyi 1,566 ± 0,145, kontrol grubu ise 1,59 ± 0,083 mmol Trolox Eq/L olarak belirlendi ve aralarında istatistiksel yönden anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,260$).
3. Tekrarlayan düşük görülen bayanların plazma GST aktivitesi 14,70 ± 4,69 kontrol grubunun ise 16,69 ± 4,64 nmol/dk/mL olarak belirlendi ve gruplar arasında anlamlı fark oldğu tespit edildi. ($p<0,05$).
4. Hasta grubu serum L-Karnitin miktarı 6,877 ± 1,799 mg/L, kontrol grubunun ise 7,685 ± 1,965 mg/L olarak tespit edildi. L-Karnitin miktarı kontrol grubundaki bireylerin serumlarında hasta grubundakilere göre anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0,05$).

Öneriler

1. Bu sonuçlara tekrarlayan gebelik kaybı olgularında oksidan-antioksidan dengenin oksidanlar yönünde bozulduğu görülmektedir. Gebelik kayıplarına klinik yaklaşımda oksidan stresin önemli bir faktör olabileceği düşünülebilir.
2. L-Karnitin'in antioksidan etkisi olduğunu savunan çalışmalara katkıda bulunulup, tekrarlayan düşükle ilişkili olabileceği belirtildi.
3. Gebelik kayıplarında GST ve L-Karnitin kan seviyelerinin yanında doku miktarlarındaki seviyelerininde tespit edilmesi anlamlı olacaktır.
4. Oksidan-antioksidan dengeyi yansıtan parametrelerin maternal kan ve dokuda, plasentada veya amniyotik sıvıda hem gebelik esnasında hemde düşük sonrasında ölçülerek karşılaştırılabileceği bir başka çalışma planlanabilir.
5. Birçok hastalığın tedavisinde kullanılan L-Karnitinin, tekrarlayan gebelik kayıplarının tedavisinde de kullanılabileceği düşünülerek bu konudaki çalışmalar arttırılabilir.

7 ÖZET

Tekrarlayan gebelik kayıpları birbirini izleyen en az iki veya daha fazla gebeliğin 20. gebelik haftasından önce spontan olarak sonlanması şeklinde tanımlanmaktadır. Glutatyon-S-transferaz (E.C. 2.5.1.18) enzimleri eksojen ve endojen toksik bileşiklerin, oksijen ve lipid peroksidasyonu ürünlerinin detoksifikasyonunu katalizler ve oksidatif stresi azaltır. L-Karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin β-oksidasyonu ile ATP üretimi için lipid metabolizmasında hayati önem taşıyan bir bileşiktir ve antioksidan etkisi olduğu öne sürülmektedir. Oksidatif stres, serbest radikal üretiminin artması veya antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği sonucu ortaya çıkar ve ateroskleroz, kalp-damar hastalıkları, enfeksiyonlar, kronik hastalıklar ve kanser gibi birçok patolojik tabloda rol oynar. Gebelik komplikasyonlarının ortaya çıkmasında da serbest radikaller suçlanmaktadır. Bu çalışmada gebeliğin önemli bir komplikasyonu olan vakalarında tekrarlayan düşük görülen bayanlarda bazı oksidan-antioksidan denge parametreleri incelendi ve sağlıklı bayanlardan oluşan kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldı.

K.T.Ü Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları polikliniği tarafından tekrarlayan gebelik kaybı tanısı ile izlenen 46 bayan hasta grubu, sağlıklı doğum yapan ve hiç düşük yapmayan 46 bayandan da kontrol grubu oluşturuldu. Bu gruplarda total antioksidan kapasite, glutatyon-S-Transferaz aktivitesi, L-karnitin, total oksidan durum ve MDA miktarları tayin edildi.

Tekrarlayan düşüğü olan bayanlarda serum total oksidan durum ve MDA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,001$, Mann Whitney U testi). Buna paralel olarak plazma MDA seviyeleri de hastalarda anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0,01$, Mann Whitney U testi). Serum total antioksidan kapasiteler yönünden hasta ve kontrol grubu arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Hasta grubunda ölçülen kan glutatyon-S-transferaz ve L-karnitin seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,05$, Student-T testi).

Tekrarlayan gebelik kayıplarında total oksidan-antioksidan dengenin oksidan etki yönünde bozulduğu gözlenmektedir. Bu şahıslarda glutatyon-S-transferaz ve L-karnitin seviyelerinin anlamlı olarak düşük bulunması düşüğe neden olan süreçleri açıklamaya yardımcı olabilir.

Anahtar Kelimeler : Tekrarlayan düşük, glutatyon-S-transferaz, L-karnitin, oksidan-antioksidan denge

8 SUMMARY

THE RELATION BETWEEN L-CARNITINE AND OXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE IN RECURRENT ABORTION CASES

Recurrent abortion is described as the spontaneous miscarriage of the two or three consecutive pregnancies before the twentieth week. Glutathione–S- tranferases (E.C.2.5.1.18) catalyzes the detoxification of endogenous and exogenous toxic compounds, lipid and oxygen peroxidation products, and so, they reduce the oxidative stress. L-Carnitine is an important molecule for the ATP production via β-oxidation of long chained fatty acids and it is also suggested that it has antioxidant properties. Increased production of free radicals and failure in antioxidant defence systems result in oxidative stress and cause many pathologic cases, such as atheroschlerosis, cardiovascular diseases, infections, chronic diseases and cancer. Free radicals are also accused of some complications of pregnancy. In this study some oxidant-antioxidant balance parameters were measured in women with recurrent miscarriage and the results were compared with healthy controls.

The patients group was formed from 46 women with habitual abortion diagnosis, followed by the gynecology clinics of Karadeniz Technical Universty Faculty of Medicine and for the control group 46 healthy women with no miscarriage history were chosen. Total antioxidant status, total oxidant status, glutathione-S-tranferase activity, L-carnitine and MDA levels were measured.

The statistical analysis of the experimental findings gave the following results: The total oxidant status and MDA values in women with habitual abortion was significantly higher than the control group ($p<0,05$ and $p<0,001$). No statistically significant difference was obtained in serum total antioxidant status between the groups. In patients blood glutathione-S-transferase activity and serum L-carnitine levels were significantly lower than the control group ($p<0,05$ and $p<0,05$).

In recurrent abortion the balance of total oxidant-antioxidant was found to be impaired in favor of oxidant effect. Reduced glutathione-S-transferase and L-carnitine levels in these individuals may help to explain the factors that cause recurrent pregnancy loss.

Keywords: Recurrent abortion, glutatione-S-transferase, L-carnitine, oksidant-antioxidant balance

9 KAYNAKLAR

1. Preston, F.E. ve Rosendaal, F.R. : İncreased fetal loss in women with heritable thrombophilia. The Lancet, 348(5):913-916, 1996.

2. Pandey, M.K., Rani, R., Agrawal, S. : An update in reccurent spontaneus abortion. Archives of Gynecology and Obstetrics., 272:95-108, 2005.

3. Rahman, I. and MacNee, W. : Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. European Respiratory Journal, 16:534-554, 2000.

4. Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R.K. : Role of oxidative stress in female reproduction. Reproductive Biology and Endocrinology, 3:28, 2005.

5. Takata, J., Matsunaga, K., Karube, Y. : Delivery systems for antioxidant nutrients. Toxicology, 180:183-193, 2002.

6. Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Down, C.A. : Structure, function and evolotion of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochemical Journal, 360:1-16, 2001.

7. Whalen, R., Boyer, T.D.: Human Glutathione S-Transferases. Seminar of Liver Disease, 18:4, 1998.

8. Calabrese, V., Stella, A.M.G., Calvani, M., Butterfield, A. : Acetylcarnitine and cellular stress response: roles in nutritional redox homeostasis and regulation of logevity genes. Journal of Nutritional Biochemistry, 17:73-88, 2005.

9. Shug, A., Paulson, D., Subramanian, R., Regitz, V. : Protective effects of propionyl-L-carnitine during ischemia and reperfusion. Cardiovascular Drugs and Therapy, **5**: 77–83, 1991.

10. Kabaoglu, C., Akısu, M., Habif, S., Mutaf, I., Turgan, N., Parıldar, Z., Özmen, D., Bayındır, O. : Effects of L-arginine and L-carnitine in hypoxia/reoxygenation-induced intestian injury. Pediatrics International, 47:10-14, 2005.

11. Rai, R., Regan, L., : Reccurrent miscarriage. Lancet, 368:601-611, 2006.

12. Li, T.C., Markis, M., Tomsu, M., Tuckerman, E., Laird, S. : Reccurrent Miscarriage: aetiology, managemant and prognosis. Human Reproduction Update, 8:463-481, 2002.

13. Speroff, L., Glass, R.H., Kase, N.G. : Klinik Jinekolojik Endokrinolojik ve İnfertilite, 5. baskı, 1996, s:841-851.

14. Brenner, B. : Inherited thrombophilia and fetal loss. Current Opinion in Hematology, 7(5):290-295, 2000.

15. Goddijn, M. and Leschot, N.J. Geneicaspect of miscarriage. Baillieretes Best Pract Res Clinical Obpstet Gnaecology, 14:855-865, 2000.

16. Jonathan, S.B., Eli, Y.A., Paula, A.H. Novak Jinekoloji. 12. Baskı, 1998, s:965-979.

17. Mc Cord, J.M. : Human disease, free radicals and oxidant/antioksidant balance. Clinical Biochemistry, 26:351-357, 1993.

18. Gate, L., Paul, J., Nguye, B.G., Tew, K.D., Tagiero, H. : Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants. Biomed & Pharmacother, 53:169-180, 1999.

19. Akyol, Ö. Şizofrende Oksidatif Stres. Kocatepe tıp Dergisi, 5:15-25, 2004.

20. Nordberg, J. and Arner, S.J. : Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biology & Medicine, 31(11):1287-1312, 2001.

21. Rahman, İ., Biswas, S.K., Kode, A. : Oxidant and antioksidant balance in airways and airway diseases. Europan Journal of Pharmacology, 533:222-239, 2006.

22. Sinatra, S.T., De Marco, J. : Free radicals, oxidative stress, oxidized low density lipoprotein (LDL), and the heart: Antioxidants and other stratagies to limit cardiovascular damage. Connecticut Medicine, 59(10):579-587, 1995.

23. Knight, J.A. : Free radicals, antioksidants aging and disease. AACC Press, Washington D C, 1999, p.1-61.

24. Gate, L., Paul, J., Nguyen Ba, G., Tew, K.D., Tapiero, H. : Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. Biomed & Pharmacother, 53:169-180, 1999.

25. Sevanian, A., Ursini, F. : Lipid peroxidation in membrane and low density lipoproteins: similarities and differences. Free Radical Biology and Medicine, 29:306-311,2000.

26. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1995, s.1-128.

27. Esterbauer, H., Wa, G., Pulh, H. : Lipid peroxidation. Br Med Bul, 49:566-576, 1993.

28. Aviram, M. : Malondialdehit affects the physico-chemical and biological charesteristics of oxidized low density lipoprotein. Atherosclerosis, 34:141-143, 1990.

29. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. : The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. Molecular Aspects of Medicine, 8: 89-93, 1985.

30. Faber, J.L., Kyle, M.E., Coleman, J.B. : Biology of disease. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. Laboratory Investigation, 62:670-679,1990.

31. Knight, J.A., : Review: Free radicals, antioxidants and the immune system. Annals of Clinical & Laboratory Science, 30:145-158, 2000.

32. Yavuzer, S. : Serbest oksijen radikallerine karşı savunma sistemleri, Hücre II oksijen ve hücre hasarı, TTB. Tıpta Temel Bilimler Kolu, Kızılcahamam, 1993, s.6-9.

33. Benzer F., Ozan, S.T. : Fasciola hepaticaile Enfekte Koyunlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidant Enzimler ve Nitrik Oksit Düzeyleri. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science, 27: 657-661, 2003.

34. Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R.K. : Role of oxidative stress in female reproduction. Reproductive Biology and Endocrinology, 3:28, 2005.

35. Knapen, F.C.M., Lange, W.P.H., Steegers, E.A.P., Peters, W.H.M. : Localization og glutathione-S-transferases α and π in human embriyonic tissues at 8 weeks gestational age. Human Reproduction, 13(5):1380-1386, 1998.

36. Aras, N., Tamer, L., Atik, U. : Glutayon-S-transferaz gen polimorfizmi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 4:393-399, 2002.

37. Sata, F., Yamada, H., Kondo, T., Gong, Y., Tozaki, S., G.Kobashi, Kato, E.H., Fujimoto, S., Kishi, R. : Glutathione-S-trnsferase M1 and T1 polymorphisms and the risk of reccurent pregnancy loss. Molecular Human Reproduction, 9(3):165-169, 2003.

38. Rajimakers, M.T.M., Bruggeman, S.W.M., Steegers, E.A.P. Peters, W.H.M. Distribution of components of the glutathione detoxification system across the human placenta after uncomplicated vaginal deliveries. Placenta, 23:490-496, 2002.

39. Eliasson, M.,Boström, M., DePierre, J.W. : Levels and subcellular distributions of detoxifying enzymes in the ovarian corpus luteum of the pregnant and non-pregnant pig. Biochemical Pharmacology, 58:1287-1292, 1999.

40. Samokyszyn, V.M., Miller, D.M., Reif, D.W., Aust, S.D. : Inhibition of superoxide and ferritin-dependent lipid peroxidation by ceruloplazmin. Journal of Biological Chemistry, 264:21-26, 1989.

41. Belcher, J.D., Balla, J., Balla, G., Jacob, D.R., Gross, M., Jacob, H.S., Vercelotti, G.M. : Vitamin E, LDL and endothelium, brief oral vitamin supplementation prevents oxidized LDL-mediated vascular injury in vitro. Arteriosclerosis Thrombosis, 13:1779-1789, 1993.

42. Çimen, B.Y. : Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. T. Klin. Tıp Bil., 19:296-304, 1999.

43. Gaetani, F.G., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, M.A., Kırkman, N.H. : Catalase and glutatione peroxidase are egually active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. Blood, 73:334-339, 1989.

44. Hennig, B., Merarini, P., Toborek, M., Mc Clain, C.J. : Antioxidant-like properties of zinc in activated endothelial cells. Journal of The American Collage of Nutrition, 18:152-158, 1999.

45. Olinescu, R.M., Kummerrow, F.A. : Fibrinogen is an efficient antioxidant. Journal of Nutritional Biochemistry, 12:162-169, 2001.

46. Leray, C., Andriamampandry, M.D., Freund, M., Gachet, C., Cazenave, J.P. : Simultaneus determination of homologues of vitamin E and coenzyme Q and products of α-tocoferol oxidation. Journal of Lipids Research, 39:2099-2105, 1998.

47. Lincoln, J., Hpyle, C.H.V., Burnstock, G. : Nitric oxide in health and disease. In Lucy, J.A. (Ed.), Biomedical research topics, Cambridge Univercity Press, 1992, p.44.

48. Bagnoti, M., Perugini, C., Cau, C., Bordone, R. Albano, E. Bellome, G.: When and why a water-soluble antioxidant becomes pre-oxidant during copper-induced low density lipoprotein oxidation: a study using uric acid. Biochemical Journal, 340:143-152, 1999.

49. Yoshikawa, M., Sakuma, N., Hibino, T., Sato, T., Fujinami, T. : HDL_3 exerts more powerful antioxidative, protective effects against copper-catalyzed LDL oxidation than HDL_2. Clinical Chemistry, 30(3):221-225, 1997.

50. Hathcock, J.N., Shao,A. : Risk assessment for carnitine. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 46:23-28, 2006.

51. Hedayati, S.S. : Dialysis-related carnitine disorder. Seminar in Dialysis, Texas, 19(6), 2006, p.323-328.

52. Rajasekar, P., and Anuradha, C.V. : Fructose-induced hepatic gluconeogenesis: Effect of L-carnitine. Life Sciences, 11:653-661, 2007.

53. Vaz, F.M. and Wanders, R.J.A. : Carnitine biosynthesis in mamals. Biochemical Journal, 361:417-429, 2002.

54. Gomez-Amores, L., Mate, A., Miguel-Carrasco, J.L., Jimenez, L., Jos, A., Camean, A.M., Revilla, E., Santa-Maria, C., Vazquez, C.M. : L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. Journal of Nutritional Biochemistry., 2006.

55. Savitha, S., Panneerselvam, C. : Mitigation of age-depent oxidative damage to DNA in rat heart by carnitine and lipoic acid. Mechanisms of ageing and development, 128:206-212, 2007.

56. Di Giacomo, C., Latteri, F., Fichera, C. Effect of acetyl-Lcarnitine on lipid peroxidation and xanthine oxidase activity in rat skeletal muscle. Neurochemical Research, 1993; **18**: 1157–1162, 1993.

57. Koudelova, J., Mourek, J., Drahot, Z., Rauchova, H. : Protective effect of carnitine on lipoperoxide formation in rat brain. Physiological Research**,** 43:387–389, 1994.

58. Rauchova, H., Dobesova, Z., Drahota, Z., Zicha, J., Kunes, J. The effect of chronic L-carnitine treatment on blood pressure and plasma lipids in spontaneously hypertensive rats. European Journal of Pharmacology, 342:235–239, 1998.

59. Sushamakumari, S., Jayadeep, A., Kumar, J.S., Menon, V.P. : Effect of carnitine on malondialdehyde, taurine and glutathione levels in heart of rats subjected to myocardial stress by isoproterenol. Indian Journal of Experimental Biology, 27: 134–137,1989.

60. Fariello, R.G., Ferraro, T.N., Golden, G.T., DeMattei, M. : Systemic acetyl-L-carnitine elevates nigral levels of glutathione and GABA. Life Science, 43: 289–292, 1988.

61. Vural, P., Akgül, C., Yıldırım, A., Canbaz, M. : Antioxidant defence in Recurrent abortion. Clinica Chimica Acta, 295:169-177, 2000.

62. Erel, Ö. : A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clinical Biochemistry, 37:277-285, 2004.

63. Erel, Ö. : Anew automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clinical Biochemistry, 38:1103-1111, 2005.

64. Yagi, K. : Assay of blood plasma or serum. Methods of Enzmology, 109:328-331, 1984.

65. Şimşek, M., Nazıroğlu, M., Şimşek, H., Çay, M., Aksakal,M., Kumru, S. : Blood plasma levels of lipoperoxides, glutathione peroxidase, beta carotene, vitamin A and E in women with habitual abortion. Cell Biochemistry and Function, 16:227-231, 1998.

66. Sane, A.S., Chokshi, S.A., Mishra, V.V., Brad, D.P., Shah, V.C., Nagpal, S. : Serum lipoperoxides in induced and spontaneus abortions. Gynecologic and Obstetric Investigation, 31:172-175, 1991.

67. Hayes, J.D., Pulford, D.J., : The glutathione-S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 30(6):445-600, 1995.

68. Shao, L., Cuı, J., Young, L.T., Wang, J.F. : The effect of mood stabilizer lithium on expression and activity of glutathione-S-transferase isoenzymes. Neuroscience, 151:518-524, 2008.

69. Lyn Petrick, N.D. : Nutrients and HIV: pert three-N-acetylcysteine, alpha-lipoic acid, L-glutamine, and L-carnitine. Alternative Medicine Reviews, 5: 290-305, 2000.

70. Rajasekar, P., Anuradha, C.V., : Effect of L-carnitine on skeletal muscle lipids and oxidative stress in rats fed high-fructose diet. Hindawi Publishing Corporation Experimental Diabetes Research 2007.

71. Steiber, A. Kerner, J., Hoppel, C. L. : Carnitine. A nutritional, Biosynthetic, and functional perspective. Molecular Aspects Of Medicine, 25:455-473, 2004.