



**T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFI
YÖNTEMİ İLE HİDROKSİPROLİN TAYİNİ VE
SİGARANIN İDRARDAKİ HİDROKSİPROLİN
DERİŞİMİNE ETKİSİ**

Betül KAYA

**Danışman
Doç. Dr. Erdal KENDÜZLER**

**Kasım, 2012
BURDUR**

**YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİ YÖNTEMİ İLE
HİDROKSİPROLİN TAYİNİ VE SİĞARANIN
İDRARDAKİ HİDROKSİPROLİN DERİŞİMİNE
ETKİSİ**

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Betül KAYA

Danışman: Doç. Dr. Erdal KENDÜZLER

II. Danışman: Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU

Kasım, 2012

BURDUR



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

BETÜL KAYA tarafından DOÇ. DR. ERDAL KENDÜZLER yönetiminde hazırlanan “YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFI YÖNTEMİ İLE HİDROKSİPROLİN TAYİNİ VE SİGARANIN İDRARDAKİ HİDROKSİPROLİN DERİŞİMİNE ETKİSİ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 26/11/2012

.....
Prof. Dr. Ali Rehber TÜRKER
Gazi Üniversitesi
Başkan

.....
Doç. Dr. Erdal KENDÜZLER
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Jüri Üyesi

.....
Yrd. Doç. Dr. Yasin ARSLAN
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Jüri Üyesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve Sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

.....
Doç. Dr. Songül ŞEN GÜRİSOY
Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. Hidroksiprolinin Genel Özellikleri	1
1.2. Hidroksiprolinin Yapısı	2
1.3. Hidroksiprolinin Sentezi	3
1.4 Hidroksiprolinin Yapısal Fonksiyonu	4
1.5 Hidroksiprolinin Tayininin Klinik Önemi	7
1.5.1 Osteoporoz	7
1.5.2 Pulmoner Fibrozis	8
1.5.3 Astım	8
1.5.4 Tümör, Kronik Üremi, Kanser	8
1.5.5 Deri Hastalıkları	9
1.5.6 Amfizem	9
1.6 Kreatinin	10
1.7 Hidroksiprolinin Tayin Yöntemleri	11
1.8 Kromatografi	13
1.9 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	14
1.10 Ultraviyole Dedektör	16
1.11 Elektrokimyasal Dedektör	17

2. MATERYAL ve YÖNTEM	18
2.1. Tayin için kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	18
2.1.1 Kullanılan Cihazlar	18
2.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.2 Yöntem	19
2.2.1 Çözeltilerin Hazırlanması	20
2.2.1.1 Stok Standart Çözeltilerin Hazırlanması	20
2.2.1.2 İç Standart Stok Çözeltisinin Hazırlanması	20
2.2.1.3 Türevleme Maddelerinin Hazırlanması	21
2.2.1.4 Hareketli Fazın Hazırlanması	21
2.2.2 Örnek Hazırlanması	22
2.2.2.1 Hidroliz	22
2.2.2.2 Türevleme	22
2.2.3 Yöntem Geçerliliği	24
2.2.3.1 Doğrusallık	24
2.2.3.2 Tekrarlanabilirlik	24
2.2.3.3 Verim (Geri Kazanma)	24
2.2.3.4 Gözlenebilme ve Tayin Sınırı	25
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	26
3.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Tayin	26
3.1.1 Tayin Koşulları için En Uygun Türevleme Süresinin Belirlenmesi	26
3.1.2 Tayin Koşulları için En Uygun Türevleme Sıcaklığının Belirlenmesi	27
3.1.3 Tayin Koşulları için En Uygun Türevleme pH'sinin Belirlenmesi	29
3.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Tayin Şartları	31

3.3 Hidroksiprolin için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisindeki Bulgular	32
3.3.1 Doğrusallık Bulguları	34
3.3.2 Tekrarlanabilirlik Bulguları	36
3.3.3 Geri Kazanım Bulguları	39
3.3.4 Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Sınırı	40
3.4 Kontrol ve Maruz Gruplarından Alınan İdrar Örneklerinin Tayinleri	41
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
5. KAYNAKLAR	49
EKLER	56
EK – 1	56
ÖZGEÇMİŞ	57

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFI YÖNTEMİ İLE HİDROKSİPROLİN TAYİNİ VE SİĞARANIN İDRARDAKİ HİDROKSİPROLİN DERİŞİMİNE ETKİSİ

Betül KAYA
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

İdrarda hidroksiprolin tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazında iki farklı dedektörle iki farklı yöntem oluşturulmuş ve çalıştırılmıştır. Yöntemlerin en önemli basamağı türevleme olduğu için en uygun türevleme süresi, sıcaklığı ve pH değeri araştırılmıştır.

Ultraviyole dedektörle yapılan ölçümlerde türevleme için en uygun türevleme süresi 20 dakika, türevleme sıcaklığı 90 °C ve türevleme pH'sı 9,5 olarak bulunmuştur. Elektrokimyasal dedektörle yapılan ölçümlerde ise en uygun türevleme süresi 10 dakika, türevleme sıcaklığı 80 °C ve türevleme pH'sı 12,5 olarak bulunmuştur. Bu şartlar altında yapılan analizlerde ultraviyole dedektör için kurulan yöntemde hidroksiprolinin alıkonma süresi 4,6 dakika, elektrokimyasal dedektörde 3,2 dakika olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, yöntemlerin ve cihazın gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları da yapılmıştır. İdrar numunelerinde geri kazanım verimi ultraviyole dedektör için 108 ± 6 ; elektrokimyasal dedektör için de 102 ± 7 bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemler sigara içen ve içmeyen bireylerden toplanan idrar örneklerindeki hidroksiprolin düzeylerini belirlemek için kullanılmıştır. Bu sayede sigara içiminin hidroksiprolin düzeyine etkisi incelenmiştir. Sigara içen bireylerle sigara kullanmayan bireylerin hidroksiprolin/kreatinin oranı karşılaştırılmış ve her iki dedektörle yapılan analizlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu tesbit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hidroksiprolin, HPLC, idrar, ultraviyole dedektör, elektrokimyasal dedektör, sigara

Danışman: Doç. Dr. Erdal KENDÜZLER, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü tarafından 0146YL11 no'lu projeden desteklenmiştir.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETERMINATION OF HYDROXYPROLINE WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD AND THE EFFECT OF SMOKING ON HYDROXYPROLINE CONCENTRATION IN URINE

Betül KAYA
Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Two different methods with two different detectors were set up and operated in the HPLC for the determination of hydroxyproline in urine samples. As the most important step of the methods was derivatization, the most appropriate time, temperature and pH of the derivatization were investigated.

The most appropriate derivatization time, temperature and pH were found as 20 min., 90 °C and 9.5 using ultraviolet detector, respectively. The most appropriate derivatization time, temperature and pH were found as 10 min., 80 °C and 12.5 using electrochemical detector, respectively. At analyses done under these conditions, the retention time of hydroxyproline for the method which was set for the ultraviolet detector was identified as 4,6 min and 3,2 min for electrochemical detector. In addition, intra-day and inter-day reproducibility running of the methods and instrument were carried out. While the recovery yield in urine samples for ultraviolet detector was 108±6, it was found 102±7 for the electrochemical detector.

Developed procedures were used for the determination of hydroxyproline levels in the urine samples obtained from smokers and non-smokers. Therefore, the effect of smoking on hydroxyproline level was examined. Hydroxyproline/creatinine ratio of smokers and non-smokers was compared, and it was determined that there was a statistically significant difference in the analyses done with both detectors.

Keywords: Hydroxyproline, HPLC, urine, ultraviolet dedector, electrochemical dedector, cigarette

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Erdal KENDÜZLER, Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Arts and Sciences, Departmant of Chemistry

The present M.Sc. Thesis was supported by Management Unit of Scientific Research Projects of Mehmet Akif Ersoy University under the project of 0146YL11.

TEŞEKKÜR

Tüm hayatım boyunca, sabır ve itina ile her durumda beni destekleyen, güç veren en değerli varlığım annem Hatice İŞİNER'e, babam Hasan İŞİNER'e ve kardeşim Nisa İŞİNER'e;

Araştırma ve çalışma azmini kendime örnek aldığım, büyük bilgi birikimi ve deneyimi ile yüksek lisans tez çalışmam boyunca yol göstericiliğini ve desteklerini benden esirgemeyen Sayın Hocam, Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü Müdürü, Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU'na;

Yüksek lisans süresince bilgisini ve yol göstericiliğini benden esirgemeyen Sayın Hocam, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Kimya Bölüm Başkanı Doç. Dr. Erdal KENDÜZLER'e;

Yüksek lisans süreci boyunca tüm bilgilerini, deneyimlerini, bakış açılarını benimle paylaşan çok değerli hocalarım Uzm. Biyolog Emrah Dural ve Yrd. Doç. Dr. Görkem MERGEN'e;

Desteği, sevgisi ve de akademik bilgisiyle tezimin başlangıcından bitimine kadar bana yardımcı olan eşim Arş. Gör. Onur Kaya'ya;

Bilimsel araştırma projesi ile tez çalışmamı destekleyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesine;

Teşekkür ederim.

Betül KAYA

BURDUR, 2012

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Hidroksiprolinin yapısı	2
Şekil 1.2 Hidroksiprolinin zwitter-iyon yapısı	2
Şekil 1.3 Hidroksiprolin oluşum tepkimesi	3
Şekil 1.4 Kollajenin amino asit sekansının şematik gösterimi	4
Şekil 1.5 Kollajenin üçlü heliks yapısı	5
Şekil 1.6 Kreatin fosfattan kreatin oluşum mekanizması	10
Şekil 1.7 Kromatografik ayırımın şekilsel gösterimi	14
Şekil 1.8 HPLC cihazını oluşturan kısımların şematik gösterimi	16
Şekil.2.1 Hidroksiprolinin türevleme ajanı FDNDEA ile türevlemenin oluşum mekanizması	23
Şekil.2.2 Hidroksiprolinin türevleme ajanı NBD-CI ile türevlemenin oluşum mekanizması	23
Şekil 3.1 Ultraviyole dedektörle yapılan ölçümlerde türevleme süresinin hidroksiprolin alanı / iç standart alanı oranına etkisi	26
Şekil 3.2 Elektrokimyasal dedektörle yapılan ölçümlerde türevleme süresinin hidroksiprolin alan sinyaline etkisi	27
Şekil 3.3 Ultraviyole dedektörle yapılan ölçümlerde türevleme sıcaklığının hidroksiprolinin alanı/ iç standart alanı oranına etkisi	28
Şekil 3.4 Elektrokimyasal dedektörle yapılan ölçümlerde türevleme sıcaklığının hidroksiprolin alan sinyaline etkisi	28
Şekil 3.5 Ultraviyole dedektörle yapılan ölçümlerde türevleme pH'sinin hidroksiprolin alanı/ iç standart alanı oranına etkisi	30
Şekil 3.6 Elektrokimyasal dedektörle yapılan ölçümlerde türevleme sıcaklığının hidroksiprolin alanına etkisi	30
Şekil 3.7 Sisteik asit ve hidroksiprolin içeren idrar örneğine ait ultraviyole dedektörle elde edilmiş kromatogram	33
Şekil 3.8 Hidroksiprolin içeren idrar örneğine ait elektrokimyasal dedektörle	34

elde edilmiş kromatogram

- Şekil 3.9** Ultraviyole dedektörle tayinde 20 dakika, 90 °C’de ve pH 9,5 de 35
türevlenmiş örneklerde iç standarda oranlanmış hidroksiprolin
derişimi - alan grafiği
- Şekil 3.10** Elektrokimyasal dedektörle 10 dakika, 80 °C’de ve pH 12,5 de 35
türevlenmiş örneklerde hidroksiprolin derişimi – alan grafiği
- Şekil 3.11** Ultraviyole dedektörle kreatinin derişim - alan grafiği 36

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Ultraviyole dedektörle tayin edilen sisteik asit ve hidroksiprolinin alıkonma süreleri	33
Çizelge 3.2 Ultraviyole ve elektrokimyasal dedektörle tayin edilen hidroksiproilin için belirlenen en uygun şartlar	33
Çizelge 3.3 Ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör kullanılarak yapılan hidroksiprolin tayinlerinde gün içi yöntem tekrarlanabilirliği ölçümlerinde; ortalama, standart sapma ve yüzde bağıl standart sapma değerleri	37
Çizelge 3.4 Ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör kullanılarak yapılan hidroksiprolin tayinlerinde günler arası yöntem tekrarlanabilirliği ölçümlerinde; ortalama, standart sapma ve yüzde bağıl standart sapma değerleri	38
Çizelge 3.5 Ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör kullanılarak yapılan hidroksiprolin tayinlerinde gün içi cihaz tekrarlanabilirliği ölçümlerinde; ortalama, standart sapma ve yüzde bağıl standart sapma değerleri	38
Çizelge 3.6 Ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör kullanılarak yapılan hidroksiprolin tayinlerinde günler arası cihaz tekrarlanabilirliği ölçümlerinde; ortalama, standart sapma ve yüzde bağıl standart sapma değerleri	39
Çizelge 3.7 Hidroksiprolinin ultraviyole dedektörle ölçüldüğü yöntem için geri kazanım değerleri	40
Çizelge 3.8 Hidroksiprolinin ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör kullanılarak HPLC ile tayininde belirlenen LOD ve LOQ değerleri	40
Çizelge 3.9 Sigara içmeyen kontrol grubunun idrar örnek sonuçları	42
Çizelge 3.10 Sigara içen maruz grubunun idrar örnek sonuçları	44

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

MEKC	Misel elektrokinetik kapiller elektroforez
OPA	o-fitalaldehit
UV	Ultraviyole
EC	Elektrokimyasal
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
EC	Uluslar arası enzim kodu
Gly	Glisin
FDNDEA	N,N- dietil-2,4-dinitro-5-floroanilin
NBD-CI	7-kloro-4-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol
Å	10 ⁻¹⁰ m, Angström
RSD	Bağıl standart sapma
SD	Standart sapma
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği

1. GİRİŞ

Hidroksiprolin esansiyel olmayan modifiye bir amino asittir. Kollajen ve kollajen benzeri proteinlerin yapılarında bulunur; esneklik ve kararlılık sağlar. Yapısal öneme sahip olması sebebiyle klinik açıdan tayini büyük önem taşır. Bu tezin amacı idrardaki hidroksiprolin miktarını hem elektrokimyasal hemde ultraviyole dedektörler ile yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı ile tayininde kullanılacak yöntemlerin iyileştirilmesidir. Ayrıca iyileştirilecek bu yöntemler ile sigara içen ve içmeyen bireylerin idrarlarındaki hidroksiprolin düzeyini belirlemektir. İdrarda tayin edilecek hidroksiprolin miktarını doğru olarak belirleyebilmek için kreatinin klirens miktarı dikkate alınmış ve düzeltme faktörü olarak kullanılmıştır.

1.1. Hidroksiprolinin Genel Özellikleri

Amino asitler proteinleri oluşturan temel yapı taşlarıdır. Hidroksiprolin bir amino asit olup hem amin hem de karboksil fonksiyonel grubu içeren bir moleküldür (Karlson, 1992).

Amino asitlerin kovalent bağlarla uç uca eklenmesiyle oluşturdukları kısa polimer zincirler, peptid, uzun polimer zincirler ise polipeptid veya protein olarak adlandırılırlar. Proteinlerin yapısına giren yirmi temel amino asit mevcuttur. Proteinlerde bunlardan çok daha farklı amino asitler de bulunabilir. Farklı amino asitler, yirmi temel amino asitle oluşturulmuş polipeptidlerin daha sonra farklılaşmaları ile oluşur. Hidroksiprolin de bu farklılaşmayla oluşmuş bir amino asittir. Bu tür amino asit farklılaşmaları, oluşturdukları proteinin özelliklerini ve işlevlerini oldukça fazla değiştirir. Bu sayede yapısal görevleri, kararlılıkları, üç boyutlu yapıları farklı olan proteinler oluşur.

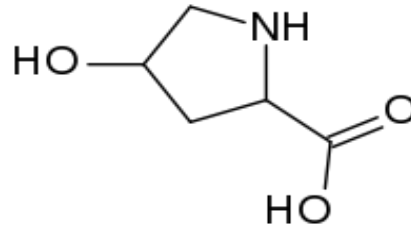
İnsanlar ve hayvanlar tarafından organizmada sentezlenemeyen besinlerle dışarıdan alınması gereken amino asitlere zorunlu ya da esansiyel amino asitler denir. Hidroksiprolin esansiyel olmayan bir amino asittir. Diyetle doğrudan alınmasına gerek yoktur. Karaciğerde, diğer amino asitlerin dönüşümü ile oluşturulur.

Hidroksiprolinin IUPAC adı (2S,4R)-4-hidroksiprolin-2-karboksilik asit, molekül formülü, $C_5H_9NO_3$, mol kütlesi, 131,13 g/mol'dür (Karlson, 1992).

1.2. Hidroksiprolinin Yapısı

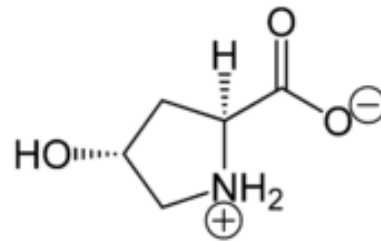
Prolin, proteinleri oluşturan 20 amino asitten biridir. Diğer tüm amino asitler birincil amin grubu taşımalarına rağmen, prolin, yan zincirindeki üç karbon atomu bir halka oluşturarak tekrar peptid bağındaki azot atomuna bağlandığı için, birincil amin grubundan (-NH₂) yoksundur. Prolindeki azot aslında ikincil amin olarak nitelendirilebilir. Prolin iminoasit olarak da adlandırılmaktadır. Prolin bir iminoasittir, serbest bir amino grubu değil imino grubu taşır (Karlson, 1992).

Hidroksiprolin, prolinin gama karbonuna bir hidroksil grubunun bağlanması ile farklılaşır. Hidroksiprolinin yapısı Şekil 1.1'de gösterilmiştir. İlk olarak 1902 yılında Fischer tarafından jelatinden kollajenin yıkım ürünü olarak izole edilmiştir.



Şekil 1.1. Hidroksiprolinin yapısı.

Amino asitlerin farklı bölgeleri negatif ve pozitif elektriksel yüke sahip olmasına karşın dışarıya karşı yüksüz görüldüğü forma zwitter-iyon formu denir. Hidroksiprolinin zwitter-iyon yapısı Şekil 1.2'de gösterilmiştir.

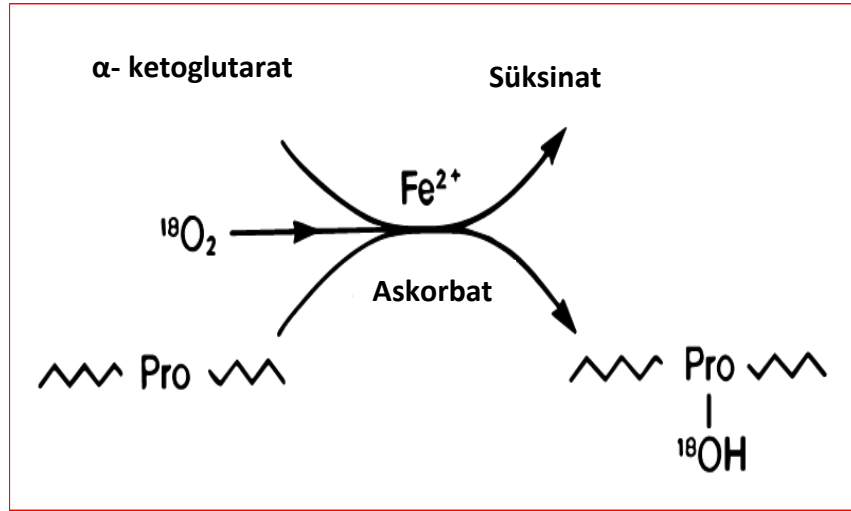


Şekil 1.2. Hidroksiprolinin zwitter-iyon yapısı.

1.3. Hidroksiprolinin Sentezi

Hidroksiprolin, prolinin, prolil hidroksilaz enzimi varlığında hidroksilasyonu ile oluşur. Oluşum tepkimesi Şekil 1.3’de gösterilmiştir.

Şekil 1.3’de gösterilen tepkime translasyon sonrası bir değişimdir. Enzimle katalizlenen bu tepkime endoplazmik retikulum lümeninde meydana gelir.



Şekil 1.3. Hidroksiprolin oluşum tepkimesi (Yaşam Bilimleri).

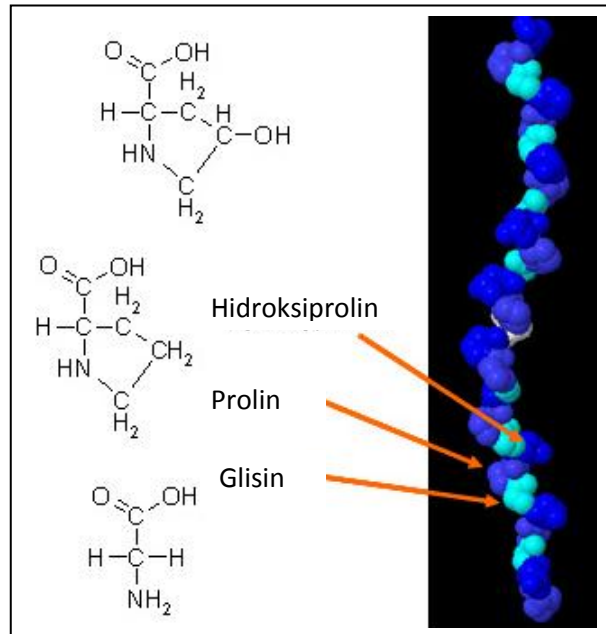
Prolil-4-hidroksilaz (EC 1.14.11.2) endoplazmik retikulum lümeninde yer alır ve prolinin hidroksilasyon tepkimesini katalizler. Bu enzim tetrametrik bir enzimdir, 2 α ve 2 β alt birimlerini içerir. Toplam molekül kütlesi 240 kilodaltondur. β alt birimi protein disülfid izomeraz ile aynıdır. α alt birimi ise katalitik aktiviteden sorumludur (Kivirikko ve Pihlajaniemi, 1998; Myllyharju, 2003b). Demir ve askorbat, prolil 4-hidroksilaz enziminin kofaktörleridir.

Kollajen biyosentezi hücre içi ve dışında birçok post-translasyonel değişim ile gerçekleştirilir. Hücre içi değişimlerde spesifik hidroksilazlar ile prolin ve lizin hidroksillenir ve 4-hidroksiprolin, 3-hidroksiprolin ve hidroksilizin oluşur (Prockop ve Kivirikko, 1995).

1.4 Hidroksiprolinin Yapısal Fonksiyonu

İnsan vücudundaki proteinlerin yaklaşık 1/3'ünü oluşturan kollajen, proteinlerin yapısında yer alan en önemli yapısal birimlerden biridir. Kollajenin üç boyutlu helikal yapısının karakteri çok yüksek bir gerilme direncine sahiptir. Bu gerilme 4-hidroksiprolin bileşiğinden kaynaklanır. 4-hidroksiprolin oluşumu ise post-translasyonel hidroksilasyon tepkimesi ile kollajen prolil-4-hidroksilaz varlığında gerçekleşir. 4-hidroksiprolin ile zengin proteinler, bitkilerde hücre duvarının yapısal bileşimi olup yapısal önem taşırlar.

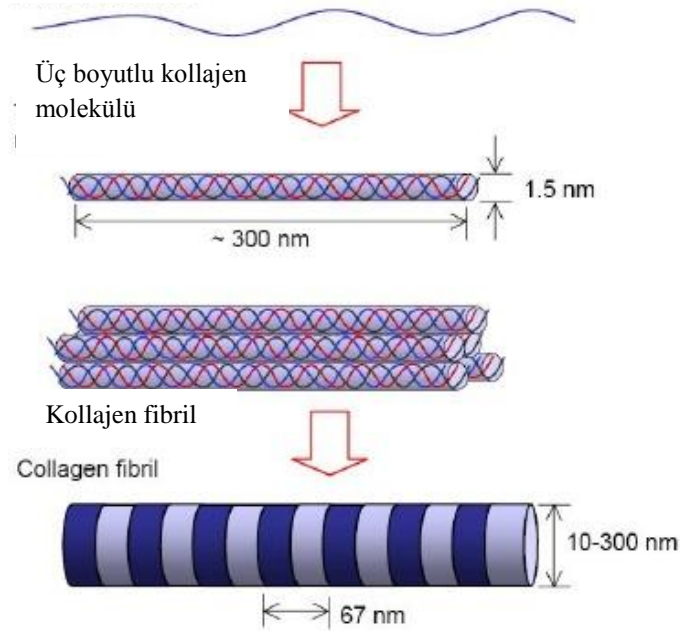
Kollajen ve kollajen benzeri proteinlerin amino asit dizilimi (Gly-X-Y)_n şeklindedir. X konumunda sıklıkla prolin, Y konumunda ise 4-hidroksiprolin bulunur. 4-hidroksiprolin kollajen molekülünde üçlü heliks oluşumunu sağlamak üzere en önemli görevlerden birini üstlenir (Kivirikko, 1993; Myllhorju ve Kivirikko, 2001) Kollajenin şekli ve amino asit sekansının şematik gösterilişi Şekil 1.4'te gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Kollajenin amino asit sekansının şematik gösterimi (Morris ve Gonsalves, 2011).

Kollajende Y pozisyonunda bulunan prolinin hidroksillenmesi kollajenin heliks yapısının termal kararlılığını da artırır (Kar ve Kishore, 2007). Hidroksillenmemiş polipeptitlerin erime sıcaklığı 24°C iken, tamamı hidroksillenmiş moleküllerinki ise yaklaşık 40°C'dur. 4-hidroksiprolinin üçlü heliks yapısının kararlılığını artırması tam olarak aydınlatılmış bir mekanizma değildir. Bir model, 4-hidroksiprolinin hidroksil grupları arasında oluşan hidrojen bağlarının böyle bir etkiyi oluşturduğunu iddia ederken daha yaygın olan model de ise yapıda oluşan su köprüleri, elektron etkileşimleri ve prolinin cis/trans oranıyla oluşan peptit bağlarının bu kararlılıkta etkili olduğunu gösterir (Holmgren ve diğ., 1998; Jenkins ve Raines, 2001; DeRider ve diğ., 2002). Kollajenin üçlü heliks yapısı Şekil 1.5'te gösterilmiştir.

Yetişkin tendon ve derisi %30, iskelet ve kalp kası %1-1,5, karaciğer ve böbrek gibi yumuşak dokular ise %0,2-0,5 oranında kollajen içerirler (Lowry ve diğ., 1941) Fetal dokular ise çok daha fazla oranda kollajen içerirler. Bu miktarlar kollajenin ne kadar önemli yapısal bir bileşik olduğunun göstergesidir (Harkness ve Harkness, 1955).



Şekil 1.5. Kollajenin üçlü heliks yapısı (Azonanotechnology, 2011).

Doğumdan sonra farklı memeli organlarında kollajen artışı ile ilgili birçok nicel çalışma yapılmıştır (Lowry ve diğ., 1946; Elster ve Lowry, 1950). Fare plasentası membranı ve fetusunda da hamilelik süresince kollajen içeriği üzerine nicel gözlemler yapılmıştır. Hamilelikte yapılan tayinler farklı zamanlarda alınan amniyon sıvısı ile yapılmıştır ve büyüyen fetusta kollajen bileşiminin artışının vücut ağırlığı artışından daha hızlı arttığı saptanmıştır (Harkness ve Harkness, 1955).

4-hidroksiprolin elastin içinde de yapısal olarak yer alır ve elastin fibrillerinin ana bileşenidir. Bu fibriller büyük arterler ve bazı özel ligamentler gibi dokuların kuru ağırlıklarının yarısını oluştururlar (Rosenbloom ve Abrams, 2002). Elastin de –Gly-X-Y- sekansını içerir fakat kollajen benzeri üçlü heliks oluşumu elastin de yoktur.

Kollajen ve elastinin yapılarına katılmasının yanı sıra 4-hidroksiprolin ayrıca kiral fosfin, ligant, karbapenem ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü gibi ürünlerin sentezinde başlangıç materyali görevi görür (Ramaswami ve Adams, 1977; Smith ve diğ., 1988).

Bitkilerde bulunan 4-hidroksiprolin yapısal öneme sahiptir. 4-hidroksiprolin içeren proteinler bitki hücre duvarında yapısal öneme sahip olup bitkiye gerilme direnci sağlarlar. Bitkilerin hücre duvarında bulunan ve yapısal öneme sahip glikoproteinler 4-hidroksiprolin ve serin açısından zengindir. 4-hidroksiprolinin çoğu uzantısı arabinosil uzantıları ile o-glikozillenmiş durumdadır. İlk halleri çözünebilir monomerler şeklindedir ve proprolin II helikal yapısına dahil olurlar. Hücre duvarının yapısını oluştururken çözünmez olurlar ve çapraz bağ oluşumuna katılırlar. Bitkinin gelişimini, korunmasını ve zedelenmelerin onarılmasını sağlarlar (Showalter, 1993; Cassab 1998).

Bitkilerde hidroksiprolince zengin diğer bir yapı ise lektindir. Bitkilerde bulunan lektinler karbohidrat bağlı proteinlerdir. Lektinler iki ayrı yapısal alan içerir. Bir alan sistein ve glisince, diğeri ise 4-hidroksiprolince zengindir. Lektinlerde hücre etkileşimleri, şeker taşınımı, tohum proteinlerinin kararlılığı ve hücre bölünmesinin kontrolünde önemli yapısal bir moleküldür (Showalter, 1993; Cassab 1998).

Arabinogalaktan proteinler sadece yüksek bitkilerde bulunan yapısal öneme sahip diğer bir yapısal bileşendir. Yapı alanin-4-hidroksiprolin zincirinin tekrarını içerir. Arabinogalaktan yapısı 4-hidroksiprolin uzantısı ile bağ kurar. Bu yapısal molekül bulunduğu yere ve biyokimyasal özelliklerine göre farklı görevler üstlenebilir. Hücrelerin birbirini tanıması, zedelenmelerin onarılması ve bitkinin korunma

mekanizmasında yer almaları bu görevlerden bazılarıdır (Showalter, 1993; Cassab 1998).

1.5 Hidroksiprolinin Tayininin Klinik Önemi

Hidroksiprolin düzeyi vücutta farklı hastalıkların göstergesidir (Kontturi ve diğ., 1974, Bellon ve diğ., 1985, Gomes ve diğ., 2006). Ayrıca hastalıkların erken tanısında, tedavi sürecince, yeni ilaçların etkisinin izlenmesinde hidroksiprolin tayinlerine oldukça sık rastlanır (Paroni ve diğ., 1992).

1.5.1.Osteoporoz

Tip I kollajen kemiklerde en çok bulunan proteindir. Kemik dokusunun organik bileşenlerinin %90' ını oluşturur ve bu da kemik oluşumu ve geri dönüşümü için ne kadar önemli olduğunun göstergesidir. Kollajen fibrilleri, kemiğe gerilme direnci sağlama görevini üstlenirler. Kollajenin amino asit dizisi prolince zengindir ve yaklaşık %50'si post translasyonel değişimle hidroksillenmiş hidroksiprolin formundadır (Endres ve Rude, 1994; Tortora ve Grabowski, 1996; Christenson, 1997). Kemik ortamının yıkımı ya da hasar görmesi ciddi sağlık problemlerine yol açar (Jordan ve Chooper, 2002). Kollajen yıkımı süresince hidroksiprolin kemikten salınır ve yeniden kollajen oluşumuna katılmaz. Bu nedenle serum ve idrardaki düzeyi bir kemik rahatsızlığı olan osteoporoz için belirteç olarak kabul edilir. Osteoporoz; kemik miktarında azalma ve kalitesindeki bozulma nedeniyle kemiklerin zayıflaması ve kırılmaya çok yatkın bir hale gelmesiyle oluşan bir hastalıktır. Osteoporoz 60-70 yaş arası kadınların 1/3 ünde, 80 yaş üzerindekiilerin ise 2/3 ünde görülen bir rahatsızlıktır (Merwe ve diğ., 2003). Değişik tekniklerle idrar, serum ve dokularda hidroksiprolin düzeyi ölçümleri yapılmaktadır. Bunun nedeni kemik oluşumunu saptamak ve kollajen metabolizmasını takip etmektir. İdrardaki hidroksiprolin her ne kadar sadece kemikteki kollajenden gelmesede kemikten salınımı idrar ve serumdaki derişimde büyük oranda etkilidir. İdrar ve serumdaki hidroksiprolin derişimini diyet, hastalıklar, deri ve diğer dokulardaki kollajenin yıkımı da etkiler (Endres ve Rude, 1994; Christenson, 1997; Euli ve diğ., 1999).

1.5.2 Pulmoner Fibrozis

Normal bir karaciğerdeki hidroksiprolin oranı yenilenmenin derecesini belirtir. Hepatik fibrozis varlığında ise önemli oranda farklılaşabilir ve fibrozisin derecesini belirtir (Gomes ve diğ., 2006). Karaciğer dokusundaki hidroksiprolin tayini sadece fibrozis tayini için değil aynı zamanda hepatik fibrozis hastalığının tedavisi sırasında ve yeni anti-fibrotik ilaçların denenmesi süresince de önem taşır (Ramos ve diğ., 1994; Souza ve diğ., 2001; Garcia ve diğ., 2002). Bu tayin hastalıklı bir karaciğerde daha karmaşıktır. Fibrozis, enfekte sıçanlarda aşılamadan 25-28 gün sonra da oluşabilir (Ferreira ve Andrade, 1993). Morfolojik olarak benzer bir durum domuz serumu ile tedavi edilen farelerde de gözlenir (Paronetto ve Popper, 1966).

1.5.3 Astım

Astım hastaları da hidroksiprolin seviyesinin ölçüldüğü çalışmalar vardır. Astımlı hastalar ile hastalığı olmayan kontrol grubunda yapılan çalışmalarda kollajen oluşumu ve akciğerdeki hidroksiprolin düzeyleri karşılaştırıldığında astım hastalarının hem kollajen depolanmasında hem de akciğerdeki hidroksiprolin seviyesinde artma gözlenmiştir (Hans ve diğ., 2012). Başka bir çalışmada ise insandaki astıma model olması için fare akciğer dokularındaki fibrozislerin küçük değişimleri izlenmiştir. Bu çalışmada pulmoner fibrozis değişimleri ile hidroksiprolinde artışlar görülmüştür (Bellon ve diğ., 1985).

1.5.4 Tümör, Kronik Üremi, Kanser

Biyolojik sıvılarda prolin ve hidroksiprolin bulunması tümör (Kontturi ve diğ., 1974) veya kronik üremi nedeniyle olabilmektedir (Dubovsky ve diğ., 1968). Üremi kanda üre bulunması durumudur ve ölüme götürebilen ciddi bir rahatsızlıktır. Hidroksiprolin üzerinden takibi yapılabilir. İdrarda ve serumda serbest halde bulunan hidroksiprolinin takibi ayrıca kemik metastazının erken tanısında, prostat ve meme kanseri üzerine uygulanan tedavi rejiminin etkinliğinin takibinde de yarar sağlar (Powlesve diğ., 1976; Mooppan ve diğ., 1983; Niell ve diğ., 1983). Fakat hastanın

durumuna göre sonuçlarda farklılıklar görülebilir. Bazı çalışmalar meme kanseri ve kemik metastazı olan hastaların yarısından fazlasının serumlarında serbest halde bulunan hidroksiprolin derişiminin artmadığını, fakat tamamına yakınının idrar hidroksiprolin derişiminin arttığını göstermiştir. Başka bir çalışma serumdaki hidroksiprolinin idrardaki hidroksiproline göre prostat kanseri durumunda kemik metastazı oluşumuna daha duyarlı bir gösterge olduğunu vurgulamıştır (Kontturi ve diğ., 1974). İdrar ve serumdaki prolin ve hidroksiprolin oranları arasında orantı bulunmayan fakat serum ve idrardaki hidroksiprolinin proline oranını anlamlı bulan çalışmalar da mevcuttur (Tsurata ve Inoue, 1998). Daha da ötesi idrar ve serumda yapılan bu tayinler sadece tanıda değil hastalıkların seyrinin izlenmesinde de oldukça önemli bilgiler verirler.

1.5.5 Deri Hastalıkları

Biyopside alınan az miktardaki deri örneğine yapılan hidroksiprolin tayini belirli cilt hastalıklarının tanısı ve izlenmesinde de kullanılabilir (Milsom, 1973).

Kollajen, dermis tabakasının ana bileşenidir ve deri hastalıklarında deride geri dönüşüm olmasını sağlar. Yara iyileşmesi sırasında, sistematik sklerodermi ve cilt tümöründe fibroblast aktifleşir ve kollajen oluşumu artar (Milsom, 1973). Bu nedenle derideki kollajen içeriğindeki değişim birçok hastalık için önemli bir göstergedir.

Daha da ötesi kollajen değişiminin ölçümü doğru tanı, özel ilaçların geliştirilmesi ve kozmetiğe yönelik çalışmalar için yararlıdır. Kollajen içeriği tayini için geliştirilen çoğu yöntem prolin ve hidroksiprolin ölçümüne dayanır (Kakinuma ve diğ., 2005).

1.5.6 Amfizem

Batılı insanların hayatını tehdit eden altı kronik hastalıktan biri de amfizemdir. Amfizem hastalığında akciğerin mekanik kararlılığında düşüş gözlenir. Kararlılığı düşen akciğer dokularının bileşenleri de değişir (Pryor ve diğ., 1984). Sigara içimi de bu hastalığın oluşmasının en önemli nedenlerinden biridir (Auerbach ve diğ., 1972). Sigara içiminin kollajen ve elastin üzerinde kimyasal değişimlere yol açtığı bulunmuştur.

Kreatinin seviyesi, 24 saatlik idrar ya da kandaki miktarı ölçülerek belirlenir. İdrar ile atılan kreatinin seviyesi, alınan proteinli yiyeceklerle, kreatin ve kreatinin içeren yiyeceklerin yenilmesi ile artar. Örneğin pişmiş et ve kaynamış sütte kreatinin bulunmaktadır ve bunları tüketmek kreatinin idrardaki düzeyini artırır (Neubert, 1998).

1.7 Hidroksiprolinin Tayin Yöntemleri

Hidroksiprolinin tayini için çok farklı yöntemler kullanılabilir. Üstünlüklerine, ortam koşullarına, uygulanabilirliklerine göre uygun yöntem seçilerek hidroksiprolin tayini yapılır.

Kolorimetrik yöntemlerle hidroksiprolin tayini kullanılan en eski yöntemlerden biridir. Yöntem hidrolizlenmiş hidroksiprolinin yükseltgenmesini içerir. Bu oksidasyonun kloramin-T ile gerçekleştirilmesi yaygındır. Tepkime ile pirol yapısı oluşturulur, bu yapı toluen içine özütlenir ve Elrich tepkeni ile tepkimeye sokularak 560 nm dalga boyunda oluşan ürünün absorbansı ölçülür (Woessner, 1961; Cheng, 1969; Bergman ve Loxley, 1970; Jamall ve diğ., 1981). Bu yöntem hidroksiprolin özüne olsa da uzun zaman alır. Bunun yanında yükseltgenme ve renk oluşum basamaklarının kontrolü oldukça zordur (Leroy ve diğ., 1964; Kivirikko ve diğ., 1967; Mee, 1973).

Hidroksiprolin tayini immunokimyasal yöntemle de yapılabilir. Enzim immunoassay yöntemi bunlardan biridir. Bu yöntem hassas ve güvenilir bir yöntemdir. Fakat antikorlar homojen kollajen içeriği gerektirebilir ve bunu da elde etmek oldukça zordur (Quasnichke ve diğ., 2005). Kullanıma hazır kitleri de pahalıdır (Colgrave ve diğ., 2008).

Elektrik oluşumlu kemilüminesans dedektör (ECL) kullanılarak da yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazında oldukça yüksek hassaslık ve seçicilikte hidroksiprolin tayini gerçekleştirilebilir. Bu yöntemin üstünlüğü türevleme adımının olmaması ve örnek hazırlama tekniğinin basit olmasıdır (Ikehara ve diğ., 2005).

Gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS) sistemi kullanılarak da hidroksiprolinin tayini yapılabilir. Bu yöntem standart çözeltilerde (Chiavari ve diğ., 2001), kollajen hidrolizatlarında (Tredget, 1990), fibroblast kültürlerinde hidroksiprolin tayinlerinde kullanılmıştır. GC-MS'in kullanıldığı bazı çalışmalarda hidroksiprolin türevlemesi yapılmıştır. Türevleme maddesi hidroksiprolinin kromatografik olarak

ölçülebilmesini sağlar. Karboksilik asit, amin ve alifatik β -hidroksil gruplarıyla hidroksiprolin türevlemeye uygun üç farklı protona sahiptir.

N-metil-N-[tert-bütül-metil-silil]-tri kloro asetamid (MTBSTFA) amino asitlerin standart solüsyonlarında, soyafasülyesinde ve sığır albümin (BSA) hidrolizatlarında türevleme ajanı olarak kullanılmıştır. Bu türevleme ajanı hidroksiprolinin her üç protonunu da türevler. MTBSTFA'nın diğer türevleme ajanlarına karşı avantajları vardır. Bunlar; MTBSTFA'nın gelişmiş aktif fonksiyonel grupları içermesi, tepkime süresinin kısa olması ve hidrolize karşı direnç sağlamasıdır (Woo ve Lee, 1995).

Alevli iyon dedektörlü gaz kromatografisi (GC-FID) farklı ortamlarda hidroksiprolin tayininde kullanılabilen diğer bir cihazdır. Amino asitlerin kromatografik davranışını geliştirmek için bu yöntemde de türevleme ajanları mevcuttur. Karboksilik asit, amin ve alifatik hidroksil fonksiyonel gruplarını içeren hidroksiprolin üç farklı proton içerir ve bu protonlar türevleme ajanı ile yer değiştirerek türevleme gerçekleşir. Hidroksiprolin için n-bütanol ile esterifikasyon ve sonradan trifluoroasetilasyon ile türevleme, hem hidroksiprolini türevleyen hem de aynı anda üç bölgeyi bloke ederek kararlılık sağlayarak hidroksiprolin tayini için uygun bir yöntemdir (Mussini ve Marcucci, 1965; Mee, 1973; Euli ve diğ., 1999).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, kapiller elektroforezin de hidroksiprolinin tayini için uygun bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalarda işaretlenmiş prolin ve hidroksiprolinin kapiler zon elektroforez ile ayrılabilmesi saptanmıştır (Terabe ve diğ., 1991). Kapiller elektroforez ile 4-hidroksiprolin tayini de yapılabilir (Chu ve diğ., 1997). Bu tayin yöntemi pahalı olması ve düşük saptama aralığı nedeniyle çok kullanışlı değildir.

Misel elektrokinetik kapiller elektroforez (MEKC) kullanılarak 3- ve 4-hidroksiprolinin sığır kas dokusundan tayini yapılmıştır (Chu ve diğ., 1997).

Hidroksiprolin tayininde en yaygın kullanılan teknik ise yüksek performanslı sıvı kromatografidir (Dawson ve diğ., 1988). Hidroksiprolinin tayininde hidroksiprolin yapısındaki kromofor eksikliği nedeniyle direk floresan dedektörle tayin edilemediğinden türevleme adımına ihtiyaç duyulur. HPLC ile hidroksiprolin tayininde yaygın olarak öncü kolon ile türevleme yapılır. Örnek olarak fenilizotiyosiyanat kullanılarak yapılan işaretleme, ultraviyole absorpsiyonunu artırması ve işaretlenmiş ürünlerin kararlılığı açısından oldukça üstün bir türevleme ajanıdır (Henrikson ve

Meredith, 1984). Fakat bu yöntem ile yapılan hidroksprolin ve prolin tayinlerinde ayırmada birincil amino asitler gibi bileşiklerin girişimi nedeniyle sorun yaşanır. Bu girişimlerin engellenmesi için iki adımda ön kolon türevlemesine gidilir. Bu prosedürlerde öncelikle amino asitlerin o-fitalaldehit (OPA) ile tepkimesi gerçekleştirilir. OPA, primer aminler ile Schiff bazı oluşturur ve imino asitler değişime uğramadan uzaklaştırılmış olurlar. İkinci adım olan türevleme de ise fenilizotiyosiyanat ya da dimetilaminoazobenzen- 4- sülfonil reaktifi kullanılarak türevleme gerçekleştirilebilir. Floresan imino asitlerin türevlerini üretmek için 9-florometil kloroformat ile tepkime oluşturularak serum ve idrarda hidroksprolin tayini yapılabilir (Einarsson, 1985). Bu tepkenler güçlü ultraviyole absorbanı sağlayarak idrar içindeki hidroksprolinin HPLC ile saptanmasında etkili olur (Bianchi ve Mazza, 1995).

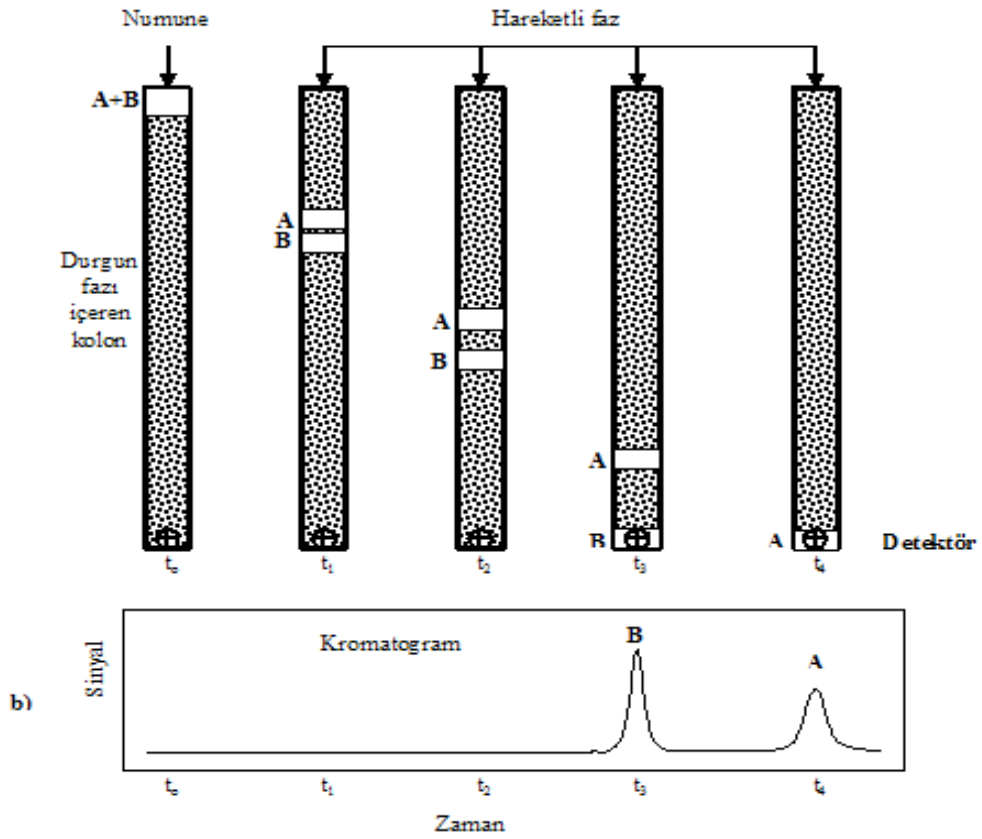
1.8 Kromatografi

Kromatografi karışımlarda bulunan birbirine yakın özellikteki maddeleri ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Kromatografik ayırmalarda örnek; gaz, sıvı veya süperkritik bir akışkan olan hareketli faz ile taşınır. Bu hareketli faz bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş kendisi ile karışmayan bir durgun faz içinden geçmeye zorlanır. Karışımdaki örnek bileşenleri hareketli ve durgun fazda farklı oranlarda dağılır. Şekil 1.7’de kromatografik ayrımı ve ayrılan ürünlere göre oluşan piklerin kromatogramı görsel olarak anlatılmaktadır. Durgun faz tarafından kuvvetli tutulan örnek bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık, durgun faz tarafından zayıfça tutulan bileşenler hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, örnek bileşenleri birbirinden kalitatif ve/veya kantitatif olarak tayin edilebilen farklı bantlar şeklinde ayrılırlar (Skoog ve diğ., 1998).

Çoğu zaman kromatografik yöntemler hareketli faza göre isimlendirilirler. Hareketli faz gaz ise gaz kromatografisi, hareketli faz sıvı ise sıvı kromatografisi, hareketli faz süper kritik sıvı ise süperkritik akışkan kromatografisi adını alır.

Durgun fazla hareketli faz arasındaki dağılıma mekanizmasına göre de isimlendirme yapılmaktadır. Eğer dağılıma yasasına göre ayrılma oluyorsa dağılıma kromatografisi, adsorpsiyon olayına göre ise adsorpsiyon kromatografisi, durgun faz ayrılanları boyutuna veya yüküne göre sıralıyorsa, boyut eleme kromatografisi, sabit faz

yalnızca tek bir biyolojik molekül içinse affinite kromatografisi, durgun faz iyon değişim ilkesi ile ayırma yapıyorsa iyon değişim kromatografisi adını alır. Kromatografi durgun fazın biçimine göre de sınıflandırılabilir. Durgun faz bir kolon içindeyse kolon kromatografisi, düzlemsel bir destek üzerindeyse düzlem kromatografisi olarak adlandırılır (Tural 2004).



Şekil 1.7. Kromatografik ayırmanın şekilsel gösterimi (Bağ H., 2011).

1.9 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

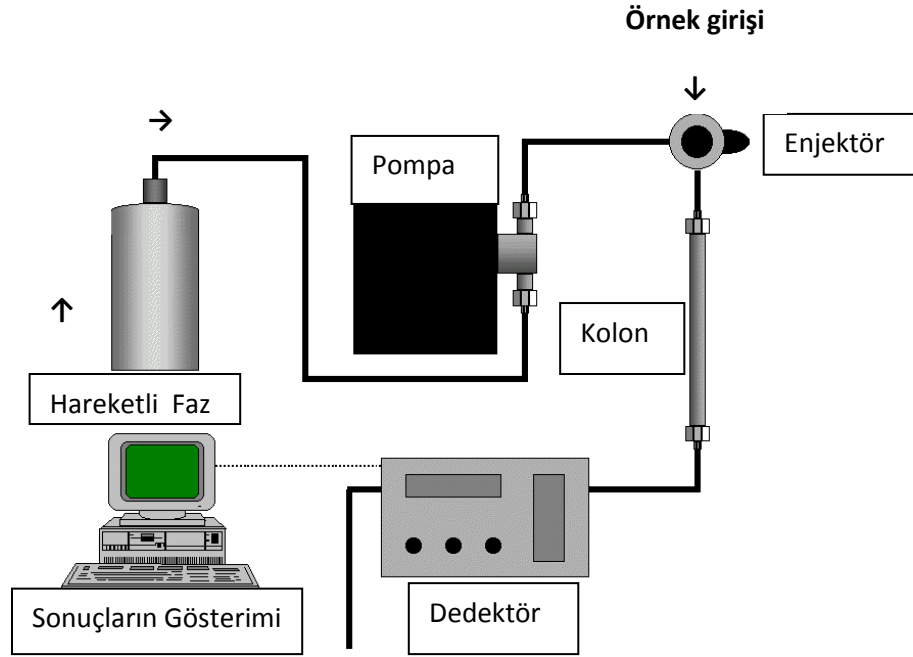
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), son teknolojik gelişmelerle birlikte kimyasal tayin yöntemi olarak en pratik ve uygulama alanı en geniş

yöntemlerden birisidir. HPLC ile yapılan kimyasal tayinler günümüzde, veterinerlik uygulamalarından çevre kimyasına, tarımdan biyomedikal ve klinik uygulamalara, toksikolojik tayinlere kadar bir çok bilimsel çalışmada sıklıkla kullanılmaktadır (Todoroki, 2011; Kakinuma ve diğ., 2005; Inoue ve diğ., 1998; Synder ve Kirkland, 1979). Bu kimyasal ayırım tekniği ile tayin süresi kısalmış, ayırım için kullanılan kolon boyutu metrelerce uzunluktaki sarmal kolonlardan 20-30 cm'lere kadar düşmüş, ayırım için gerekli çözünürlük oldukça yükselmiştir. Bu üstünlükleri sayesinde HPLC; ince tabaka kromatografisini ve elektroforez yöntemlerini geride bırakmıştır (Brown, 1989).

Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri duyarlılığı, doğru nicel tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir (Skoog ve diğ., 1998).

HPLC çalışma prensipleri açısından basit, pratik, bir o kadar da yüksek çözünürlüklü bir tayin yöntemidir. Yüksek basınç altında (100 – 200 bar) gerçekleştirilen bu kromatografi yönteminde örnek, pompa ile kolon girişi arasında bir enjektör yardımıyla uygulanmaktadır. Cihaz üzerindeki her ünite bir diğeri ile koordineli bir şekilde çalışmaktadır. Son teknolojik gelişmelerin, yönteme otomasyon sağlanması sonucu, cihaz elle işletilen uygulama hatalarından arındırılmıştır. HPLC kullanımında belirtilen, cihazın çalışma prensiplerinin dikkate alınması ile tayinin kalitesi arttırılmış, uygulama sırasında karşılaşılabilecek olan problemler de ortadan kaldırılmış olacaktır. Doğru bir tayin için piklerde görülen hatalardan, hareketli faz içeriği, kolon, kolon malzemesi ve doğru dedektör seçimine kadar tüm özellikler sırayla ele alınmalıdır. Ayrıca tayine etki edebilecek olan tüm parçalar için en uygun şartların araştırılması ile uygulanacak olan yöntemler verimli hale getirilmelidir (Weston ve Brown, 1998). Şekil 1.8'de HPLC'nin kısımları gösterilmiştir.

Kolonda birbirinden ayrılan maddeler taşıyıcı faz ile birlikte ölçüm birimi olan dedektöre gelirler. Dedektör maddenin derişimi ile doğru orantılı bir özelliğini ölçmelidir. Dedektör hareketli faz ile ayrılan analite duyarlı olmalıdır.



Şekil 1.8. HPLC cihazını oluşturan kısımların şematik gösterimi (Lcresources).

Lambert Beer kanununa göre zamana karşı absorbans ölçen ultraviyole dedektör ile sadece elektroetkin maddelere uygulanabilen ve indirgenme yükseltgenme sırasında açığa çıkan yanıt akımının, elektrokimyasal hücrede zamana karşı ölçümünün yapıldığı bir dedektör sistemi olan elektrokimyasal dedektör en çok kullanılan dedektörlere dendir.

1.10 Ultraviyole dedektör

Birçok HPLC cihazında UV dedektörü denilen fotometrik dedektörler kullanılmaktadır. Dedektörden örnek geçişi olmadığında UV dedektör hücresinden geçmekte olan ışık sensörde en yüksek seviyede sinyal vermektedir. Örnek dedektör içerisine girerse dedektör sinyalinde değişmeye neden olacaktır. Bu sinyal elektronik olarak veri işleme sistemine aktarılır ve kromatogramda pozitif pik olarak gözükür. Hücredeki örneğin derişimi oranında pik büyük görüntülenir. dedektör diğer tüm değişikliklere de cevap verecektir. Örneğin tanecikler veya kir, hücrenin içinden geçen ışığı engellediği için zemin sinyalinde artışa neden olacaktır. Hücre içindeki bir hava kabarcığı da geçen ışığa büyük ölçüde etki edecek, alınan sinyal ölçüğün dışına çıkacaktır. Dalga boyu, ultraviyole dedektörle tayin açısından önemlidir. Genel kural

taini yapılacak analitin en yüksek absorbans değerinin olduğu dalga boyunu seçmektir. Yanlış dalga boyu kullanmak düşük pik yüksekliğine bazen de piksiz bir kromatograma sebep olabilir (Weston ve Brown, 1998).

En basit UV absorpsiyon dedektörleri, ışın kaynağı olarak bir cıva lambası kullanan filtreli fotometrelerdir. Girişim filtresi bulunan döteryum veya tungsten telli ışın kaynakları da kullanılabilir. Bazı modern cihazlar, farklı türleri teşhis için kolaylıkla değiştirilebilen ve çeşitli filtreleri üzerinde taşıyan filtre tekerlekleri ile donatılmıştır. Böyle cihazlar, örneklerin nitel bileşiminin bilindiği durumlarda, filtrelerin uygun sırada seçilmesi yoluyla tekrarlanabilir nicel tayinler için de uygundur. Çoğu zaman filtrelerin değiştirilmesi bilgisayar kontrollüdür (Skoog ve diğ., 1998).

1.11 Elektrokimyasal dedektör

Elektrokimyasal dedektörler amperometri, polarografi, kulometri ve kondüktometri esasına göre çalışmaktadır. Bu tez kapsamında kullanılan elektrokimyasal dedektör, amperometri esasına göre çalışmaktadır.

Her ne kadar elektrokimyasal dedektörler henüz optik dedektörlerle yarışamazsa da, duyarlılık, basitlik, kullanılabilirlik ve yaygın kullanım alanı gibi birçok yönden üstünlükler sunmaktadır. Bu üstünlüklerden biri de, 16 tane organik fonksiyonlu grubun (hidrokarbonlar, azinler, amidler, aminler, fenoller, aromatik hidrokarbonlar, kinolinler, olefinler, esterler, ketonlar, aldehitler, konjuge esterler, eterler, diazo bileşikleri, nitro bileşikleri, halojenler) herhangi birini içeren türlerin amperometrik, polarografik ve kulometrik işlemlerle belirlenebilmesidir. Bu yüzden elektrokimyasal dedektörler, HPLC tekniğinin uzun zamandır ihtiyacı olan duyarlı, genel dedektör görevini yerine getirme potansiyelinde olduğu söylenebilir (Skoog ve diğ., 1998).

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Tayin İçin Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

2.1.1 Kullanılan Cihazlar

—HPLC	- Cihaz sistemi HP AGILENT 1100 SERIES
	- Pompa G 1310 A Isopump
	- Dedektör G 1314 A VWD
	- Elektrokimyasal Couluehem II
	- Enjektör G 13 28 A, RHEODYNE
	-Yazılım, ChemStation 08.3
— HPLC Kolon	-WATERS C18 3,5 µm, 4,6 x 150 mm
— Otomatik Pipetler	- RAININ SL 100 µl
	- RAININ SL 1000 µl
	- RAININ SL 10000 µl
—Pipet Uçları	-RAININ
— Mikro Filtre	-AGILENT 0,45 µm Gözenek Çaplı
— Saf Su Cihazı	-NÜVE NS 245
— Ultra Saf Su Cihazı	-HUMAN UP 900 SCHOLAR - UV
— Elektronik Hassas Terazî	-SCHIMADZU LIBROR
— Derin Dondurucu (-20 °C)	-BOSCH GTN 2704/05
— Santrifüj Aleti	-HERAUS SEPATECH LABOFUGE 200
— Vorteks Karıştırıcı	-NÜVE NM 110
— Azot Uçurma Sistemi	-TECHNE SAMPLE CONCENTRATOR DB- 3 Dri-Block
— Ultrasonik Banyo	-BANDELIN SONOREKS TK100H
— Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı	-MIRAK THERMOLYNE SP72720 - 26
— pH Metre	-METLER TOLEDO SEVEN MULTI
— Etüv	-NÜVE
— Cam Malzemeler	

2.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

— 4-klor -7-nitrobenzofurazan	-SIGMA-ALDRICH
—Trans 4-hidroksi-L-prolin	-ALDRICH
—2,4-Dinitro-5-floroanin	-ALDRICH
—Aseton	-MERCK
—Sodyum fosfat	-MERCK
— Asetonitril	-MERCK
—Hidroklorik asit (%37, v/v)	-MERCK
—Metanol	-MERCK
—Trietilamin	-MERCK
—L-Sisteik asit	-SIGMA-ALDRICH

2.2 Yöntem

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde ultraviyole dedektörle yapılan çalışmada Paroni ve diğ. (1992), kullandığı yöntem geliştirilmiş ve deneysel koşullarda değişiklikler yapılmıştır. Bu çalışmada Paroni ve arkadaşları idrar hidroksiprolinin basit ve hızlı bir yöntemle tayin edilmesi amaçlanmıştır (Paroni ve diğ., 1992). Türevleme basamağı yöntemin sunuca en çok etki eden adımı olduğu için bu adımda kullanılan parametrelerde en uygun koşullar araştırılmıştır. Bunun için türevleme süresi, türevleme işleminin yapıldığı pH, türevlemenin yapıldığı sıcaklık değiştirilerek hidroksiprolin tayini için en uygun koşullar belirlenmiştir. Cihaz ve kurulan yöntemi geçerli kılma çalışmaları da yapılmıştır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde elektrokimyasal dedektörle yapılan çalışmada Welch ve diğ. (1993) kullandığı yöntem geliştirilmiş ve deneysel koşullarda denemeler ve değişiklikler yapılmıştır. Welch ve arkadaşlarının yaptığı bu yöntemde idrar örneklerine hidroliz, kuruluğa kadar uçurma ve türevleme adımları uygulanmıştır. Türevlemenin kısa sürmesi ve oluşan türevlenmiş hidroksiprolinin birkaç saat kararlı kalması önemsenmiştir (Welch ve diğ., 1993). Bu yöntem için türevleme işleminin yapıldığı pH, sıcaklık ve süre değiştirilerek hidroksiprolin tayini için en uygun koşullar belirlenmiştir. Cihaz ve kurulan yöntemin geçerli kılma çalışmaları da yapılmıştır.

Bu yüksek lisans tez kapsamında, yukarıda bahsedilen yöntemlerin duyarlılıkları artırılmıştır. Bu amaçla türevleme basamaklarında iyileştirmeler yapılmıştır. Geliştirilen yöntem sigara içen ve içmeyen kişilerin idrarlarındaki hidroksiprolin tayinlerinde kullanılmıştır.

2.2.1 Çözeltilerin Hazırlanması

2.2.1.1 Stok Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Deneysel olarak ultraviyole dedektörle tayini yapılacak olan hidroksiprolin ana stok çözeltisi 1,00 g/L olacak şekilde 10,0 mmol/L derişimdeki hidroklorik asit çözeltisi içerisinde hazırlandı. Ana stok standart çözeltiden, ultra saf su ile seyreltilerek hidroksiprolin için derişimleri 5,00 mg/L, 10,0 mg/L, 25,0 mg/L, 50,0 mg/L, 100 mg/L olan standart çözeltileri hazırlandı.

Elektrokimyasal dedektörle tayini yapılacak olan hidroksiprolin standardı %25 metanol çözeltisi içerisinde çözünerek 1,00 g/L derişimde olacak şekilde ana stok çözeltisi hazırlandı. Hidroksiprolin stok standart çözeltileri ultra saf suyla seyreltme yapılarak 5,00 mg/L, 10,0 mg/L, 25,0 mg/L, 50,0 mg/L, 100 mg/L derişimlerinde hazırlandı.

Tüm hidroksiprolin standart stok çözeltileri amber renkli saklama şişelerine aktarılmış ve -20 °C'da muhafaza edilmiştir.

Kreatinin ana stok çözeltisi derişimi 200 mg/L olacak şekilde ultra saf su ile hazırlanmıştır. 5,0; 10,0 ve 25,0 mg/L derişimlerde ana stoktan ultra saf suyla seyreltilerek ara stok çözeltileri hazırlandı ve beş kişinini idrarlarından alınan eşit hacimler üzerine eklenerek standart katma yöntemiyle standart çözeltileri hazırlandı.

Bu standart çözeltiler kalibrasyon grafiği çizimi, yöntem geçerliliği ve verimlilik testleri için kullanılmıştır.

2.2.1.2 İç Standart Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Deneysel olarak ultraviyole dedektörle tayini yapılacak olan hidroksiprolin için iç standart olarak Paroni ve diğ. (1992), yönteminde kullanılan sisteik asit seçilmiş olup

1,00 g/L derişimli stok çözeltilisi ultra saf su ile hazırlandı. 2,00 mol/L derişimde (pH: 9,3) sodyum hidrojen karbonat tamponu haftalık hazırlandı. Çalışmada iç standart olarak kullanılan 40 mg/L'lik sisteik asit çözeltilisi haftalık olarak hazırlandı. Bu haftalık çözeltiler, stok sisteik asit çözeltilisinden 2,00 mol/L'lik sodyum hidrojen karbonat tamponu ile hazırlandı.

2.2.1.3 Türevleme Maddelerinin Hazırlanması

Ultraviyole dedektörle yapılacak olan hidroksiprolinin türevleme maddesi N,N-dietil-2,4-dinitro-5-floroanilin (FDNDEA) stok çözeltilisi 5 g/L derişimde olacak şekilde asetonitril içerisinde çözümlenerek hazırlandı. Kullanımına kadar 4 °C'da muhafaza edildi (Paroni ve diğ., 1992).

Elektrokimyasal dedektörle yapılacak olan hidroksiprolinin türevleme maddesi olan 7-kloro-4-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol (NBD-CI) ise 8 mM derişimde metanol içerisinde çözümlenerek hazırlandı. Bozulmaması için 4°C'de muhafaza edildi (Richard ve diğ., 1993).

2.2.1.4 Hareketli Fazın Hazırlanması

Hidroksiprolinin ultraviyole dedektörle yapılacak olan tayini için kullanılan hareketli faz hacimce % 80 asetat tamponu ve % 20 asetonitril karışımıdır. Asetat tamponu, 3 mL susuz asetik asit ve 6 mL trietilenaminin 1 L su ile karıştırılıp pH değeri 5 mol/L hidroklorik asit çözeltilisi ile 4,3 olacak şekilde ayarlanmasıyla hazırlandı.

Hidroksiprolinin elektrokimyasal dedektörle yapılacak olan tayini için kullanılan hareketli faz hacminin %83'ü 50 mM NaH₂PO₄ ve %17'si metanol olacak şekilde hazırlandı. NaH₂PO₄ çözeltilisinin pH değeri ise fosforik asit kullanılarak 3,4 olacak şekilde ayarlandı.

Hareketli fazlar hazırlandıktan sonra hava pompası yardımıyla mikro filtreden geçirilmiştir. Bu işlemin nedeni, hazırlama aşamasında hareketli fazın içerisine istenmeyen parçacıkların karışması sonucu kolonda oluşabilecek hasarları engellemektir. Filtre edilen çözeltili ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek sıvı içerisindeki gaz uzaklaştırıldı ve sonrasında yeniden pH ayarı yapılarak 4°C'de

muhafaza edilmiştir. Her kullanım öncesi çözelti oda sıcaklığına ulaşması için 1 saat beklenmiş, pH'sı gözden geçirilerek HPLC'de hareketli faz olarak kullanılmıştır.

2.2.2 Örnek Hazırlanması

Sigara kullanan maruz grubun idrarları ve sigara kullanmayan kontrol grubunun idrarları Kırıkkale Hacı Hidayet Doğruer Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesinden sağlanmıştır. Bu örneklerin alınabilmesi için, 34-739 karar numarası ve 25/07/2011 tarihle, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan gerekli etik izin alınmıştır. Adı geçen belge Ek1'de verilmiştir.

2.2.2.1 Hidroliz

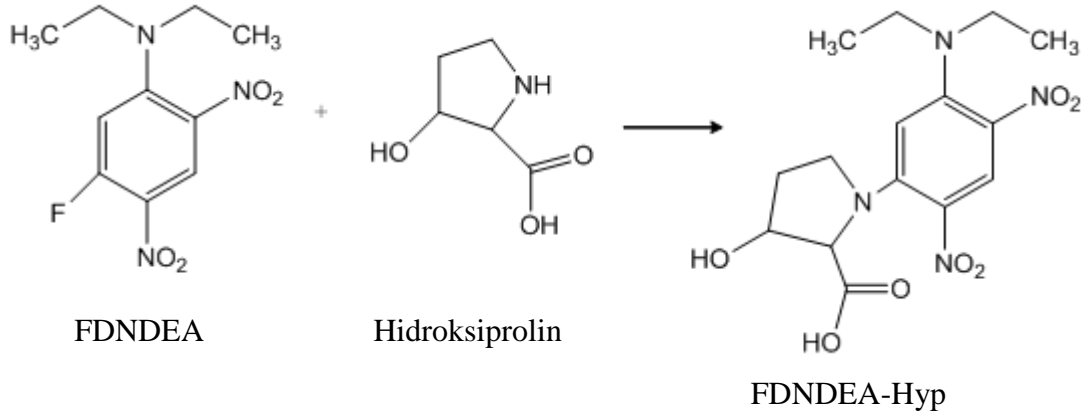
HPLC'de ultraviyole dedektörle analizi yapılacak olan idrar örneklerin hidrolizinde Paroni ve diğ. (1992), yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle göre 50 µL örnek, 50 µL saf su ve 100 µL derişik HCl karıştırılmış ve 16 saat 100 °C'de hidrolizlenmiştir.

HPLC'de elektrokimyasal dedektörle yapılacak olan örneklerin hidrolizinde Welch ve diğ. (1993) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle göre 50 µL örnek, 50 µL derişik HCl karıştırılmış ve 20 saat 115 °C'de hidrolizlenmiştir.

2.2.2.2 Türevleme

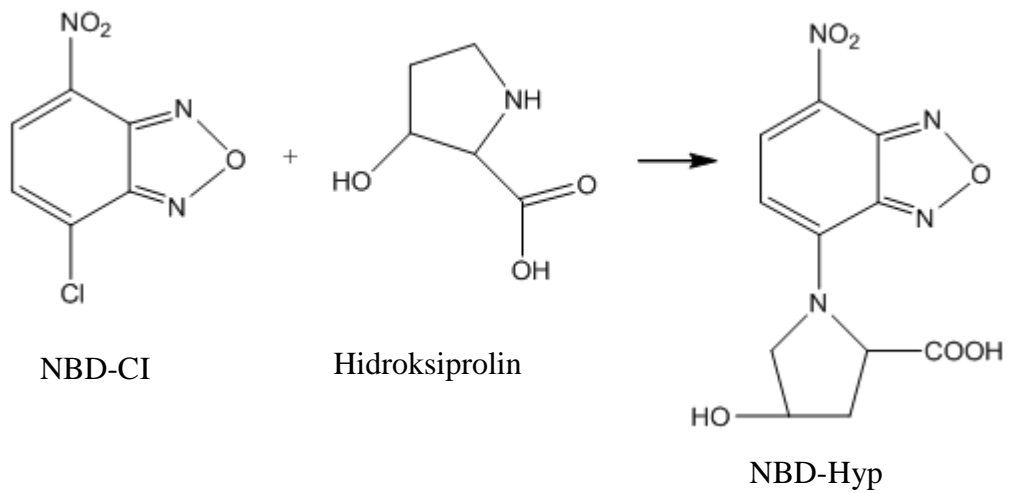
Hidroksiprolinin ultraviyole dedektörle tayini için hidrolizleme işlemine tabi tutulmuş idrar örneği azot uçurma sistemine yerleştirilerek buharlaştırıldı. Vialde kalan kalıntı 200 µL asetonla çözülerek tekrar aynı sistemle buharlaştırıldı. Vialde kalan kalıntı tekrar 200 µL 40 mg/L sisteik asit çözeltisinde çözülerek türevleme işlemine geçildi. 50 µL'si alınan çözeltiye 50 µL FDNDEA çözeltisi eklenerek 100 °C'da 20 dakika bekletilerek türevleme işlemi gerçekleştirildi.

Türevlemenin sona ermesinden sonra çözelti azot uçurma işlemine tabi tutuldu. Vialdeki kalıntı 500 µL hareketli faz çözeltisinde çözüldü ve çözelti kolona verildi. Türevleme mekanizması Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Hidroksiprolinin türevleme ajanı FDNDEA ile türevlemenin oluşum mekanizması (Liu ve Sayre, 2004).

Hidroksiprolinin elektrokimyasal dedektörle tayini için hidrolizlenen idrar örneği azot uçurma sistemine yerleştirilerek buharlaştırıldı. Kalıntı 200 µL %25 metanol ile çözülerek türevleme işlemine geçildi. Örnek üzerine 200 µL türevleme tamponu ve 50 µL NBD-Cl ilave edildi. Elde edilen çözelti 80 °C’da 10 dakika karıştırılarak türevleme işlemi gerçekleştirildi. Türevleme tamponu olarak 0,10 M NaH₂PO₄ çözeltisi kullanıldı. Türevleme işlemi mekanizması Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Hidroksiprolinin türevleme ajanı NBD-Cl ile türevlemenin oluşum mekanizması (Ahnoff ve diğ., 1981).

2.2.3 Yöntem Geçerliliği

2.2.3.1 Doğrusallık

Doğrusallığın ilk ve doğal anlamı, Y' nin koşullu beklenen değerlerinin X' in doğrusal bir fonksiyonu olduğudur. Doğrusallığı kontrol etmek için yapılabilecek en basit işlem regresyon doğrusu ile kalibrasyon verilerinin görsel olarak kontrol edilmesidir. Bazı durumlarda doğrusal olmama durumu o kadar belirgindir ki istatistiksel test yapılmaya gerek duyulmaz. X ve Y arasındaki doğrusallığın iyi olması için R² değerinin 1'e yakın olması beklenir.

İdrar havuzundan aynı miktarda alınan örneklerle, artan derişimlerde standart hidrokspirolin çözeltileri ilave edildi. Elde edilen bu standart çözeltilerin hidrokspirolin derişimleri farklı, ortamları ise aynıdır. Hem ultraviyole dedektörle hem de elektrokimyasal dedektörle yapılan tayinlerde aynı derişim aralığında doğrusallık arandı. Ayrıca örnek çözeltilerin derişimlerinin, sinyal alanının derişimle doğrusal olarak değiştigi aralıkta olmasına dikkat edildi. Derişimler bu aralığın dışında ise seyreltme veya derişirme yolu ile bu aralığa çekildi.

2.2.3.2 Tekrarlanabilirlik

Gün içi ve günler arası yöntem ve cihaz tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı. Bu çalışma, hidrokspirolin ölçümü yapılmak istenildiğinde, belirlenen tayin şartlarında bu yöntemler çalıştırıldığında, birbirine yakın sonuçlar alınıp alınmayacağını belirlemek amacıyla gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, gün içi ve günler arası yöntem ve cihaz tekrarlanabilirliklerinde ne kadar sapma olduğunu göstermiştir. Bu çalışma hem ultraviyole dedektörle geliştirilen yöntemde hem de elektrokimyasal dedektörle gerçekleştirilen yöntemde hidrokspirolin tayini için ayrı ayrı yapılmıştır.

2.2.3.3 Verim (Geri Kazanma)

Normal bir idrar örneği içerisinde hidrokspirolin bulunacağından geri kazanma verimi için öncelikle idrar havuzundan alınan örneğin hidrokspirolin düzeyine

bakılmıştır. Ardından bu çözeltilere bilinen derişimlerde hidroksiprolin ilavesi yapılmıştır. İlave edilen standart hidroksiprolin derişimi yaklaşık örneklerdeki hidroksiprolin derişimi kadar ve iki katı kadar olacak şekilde çalışılmıştır. Örneklerdeki hidroksiprolin derişimi hem ultraviyole dedektörle geliştirilen hem de elektrokimyasal dedektörle geliştirilen yöntemle ayrı ayrı yapılmıştır. Bulunan sonuçlarda geri kazanma verimi aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri kazanım verimi (\%R)} = \frac{\text{Deneysel veri}}{\text{Kuramsal veri}} \times 100$$

2.2.3.4 Gözlenebilme ve Tayin Sınırı

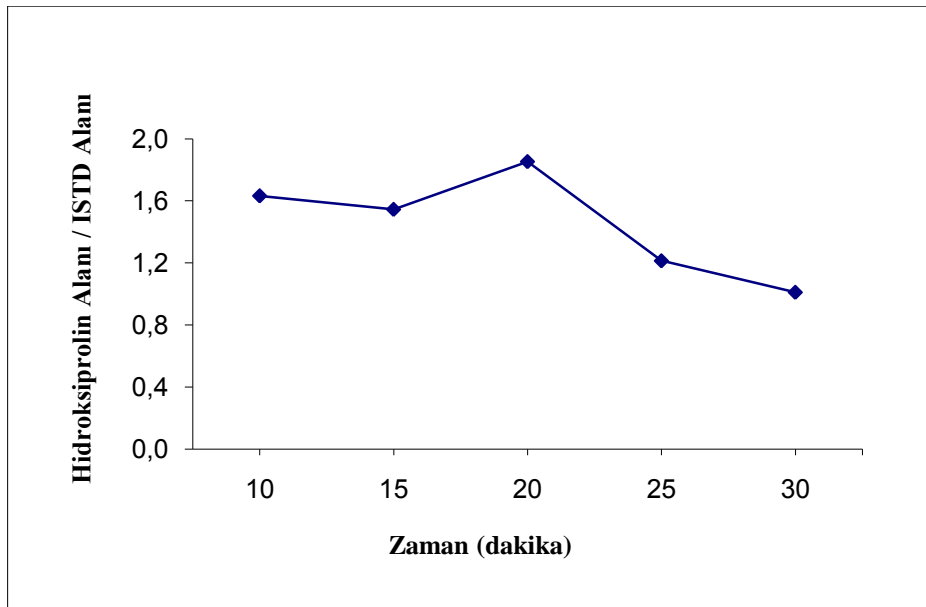
Ön çalışmalardan elde edilen verilerden faydalanarak, gözlenebilme ve tayin sınırı belirlemede kullanılacak olan derişim, kalibrasyon grafiğindeki en düşük derişimin yarısı olarak belirlenmiştir. Bu derişimde yapılan ölçümler sonrasında elde edilen alanlardan bulunan derişim değerlerinin standart sapmasının 3 katına karşılık gelen derişim gözlenebilme sınırı ve 10 katına karşılık gelen derişim tayin sınırı olarak hesaplanmıştır. Gözlenebilme sınırı (LOD) %95 güvenle zemin gürültüsünden fayırt edilebilen fakat miktarı belirlenemeyen en küçük analit derişimidir. Tayin sınırı (LOQ) ise uygun doğruluk ve kesinlikle miktarı saptanabilen en küçük derişimdir.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Tayin

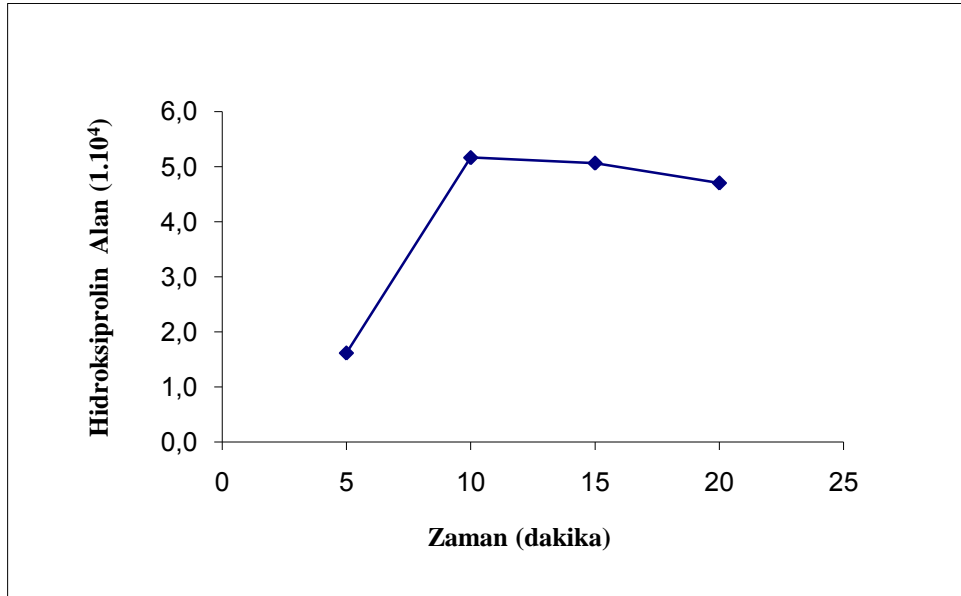
3.1.1 Tayin Koşulları için En Uygun Türevleme Süresinin Belirlenmesi

Ultraviyole dedektör kullanılarak yapılacak hidroksiprolin tayinlerinde ilk olarak idrar örneği ortamında en uygun türevleme süresi belirlenmiştir. En uygun türevleme süresini belirlemek için 50 µL idrar örneği ve 25 mg/L derişimde 50 µL hidroksiprolin ile 90 °C sıcaklıkta ultraviyole dedektörle çalışılmıştır. Türevleme süresi olarak 10, 15, 20, 25, 30 dakika denenmiştir. Şekil 3.1’de uygulanan türevleme süresinin hidroksiprolin/iç standart alanlarının oranına etkisini gösteren tayin sonuçları verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre cihazın verdiği alan ölçümlerinden en uygun türevleme süresi 20 dakika olarak bulunmuş ve tayinlerde örnekler 20 dakika türevlemede bırakılmıştır.



Şekil 3.1. Ultraviyole dedektörle yapılan ölçümlerde türevleme süresinin hidroksiprolin alanı / iç standart alanı oranına etkisi.

Elektrokimyasal dedektör kullanılarak yapılacak hidroksiprolin tayinlerinde ilk olarak idrar örneği ortamında en uygun türevleme süresi belirlenmiştir. En uygun türevleme süresini belirlemek için 50 µL idrar örneği ve 25 mg/L derişimde 50 µL hidroksiprolin ile 80 °C sıcaklıkta elektrokimyasal dedektörle çalışılmıştır. Türevleme süresi olarak 5, 10, 15, 20 dakika denenmiştir. Şekil 3.2’de uygulanan türevleme süresinin hidroksiprolin alanına etkisini gösteren tayin sonuçları verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda cihazın verdiği alan ölçümlerinden en uygun türevleme süresi 10 dakika olarak bulunmuş ve tayinlerde örnekler 10 dakika türevlemede bırakılmıştır.

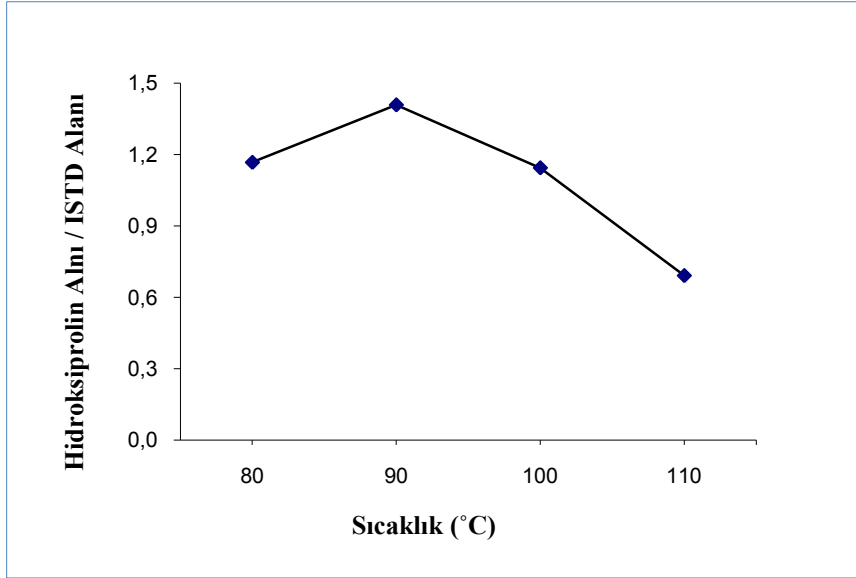


Şekil 3.2. Elektrokimyasal dedektörle yapılan ölçümlerde türevleme süresinin hidroksiprolin alan sinyaline etkisi.

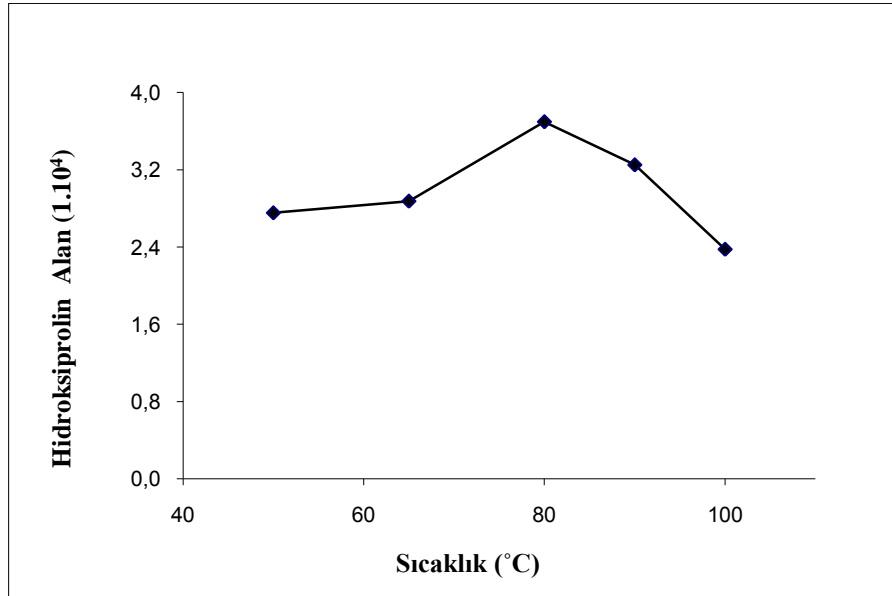
3.1.2 Tayin Koşulları için En Uygun Türevleme Sıcaklığının Belirlenmesi

En uygun türevleme süresini belirlemek için 50 µL idrar örneği ve 25 mg/L derişimde 50 µL hidroksiprolin ile 20 dakika ultraviyole dedektörle çalışılmıştır. Türevleme sıcaklığı olarak 80, 90, 100, 110 °C denendi ve en iyi türevleme sıcaklığı elde edilen alanlara bakılarak 90 °C olarak bulundu. Daha sonraki çalışmalarda ve

hidroksiprolin tayinlerinde örnekler 90 °C'da türevlemede bırakıldı. Şekil 3.3'de elde uygulanan türevleme sıcaklığına göre elde edilen tayin sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.3. Ultraviyole dedektörle yapılan ölçümlerde türevleme sıcaklığının hidroksiprolinin alanı/ iç standart alanı oranına etkisi.



Şekil 3.4. Elektrokimyasal dedektörle yapılan ölçümlerde türevleme sıcaklığının hidroksiprolin alan sinyaline etkisi.

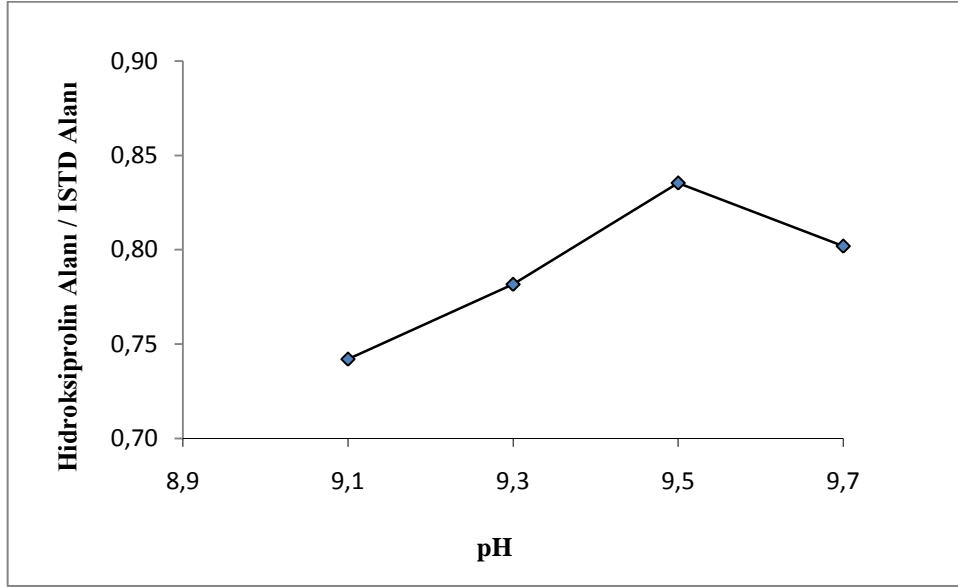
En uygun türevleme süresini belirlemek için 50 µL idrar örneği ve 25 mg/L derişimde 50 µL hidroksiprolin ile 20 dakika elektrokimyasal dedektörle çalışılmıştır. Türevleme sıcaklığı olarak 50, 65, 80, 90, 100 °C olacak şekilde beş farklı sıcaklık denendi. Elde edilen sonuçlarda en uygun türevleme sıcaklığı 80 °C olarak bulundu ve daha sonraki çalışmalarda ve hidroksiprolin tayinlerinde örnekler 80 °C'da türevlenmeye bırakıldı. Şekil 3.4'de uygulanan türevleme sıcaklığına göre elde edilen alan sinyallerinin sonuçları verilmiştir.

3.1.3 Tayin Koşulları için En Uygun Türevleme pH'sinin Belirlenmesi

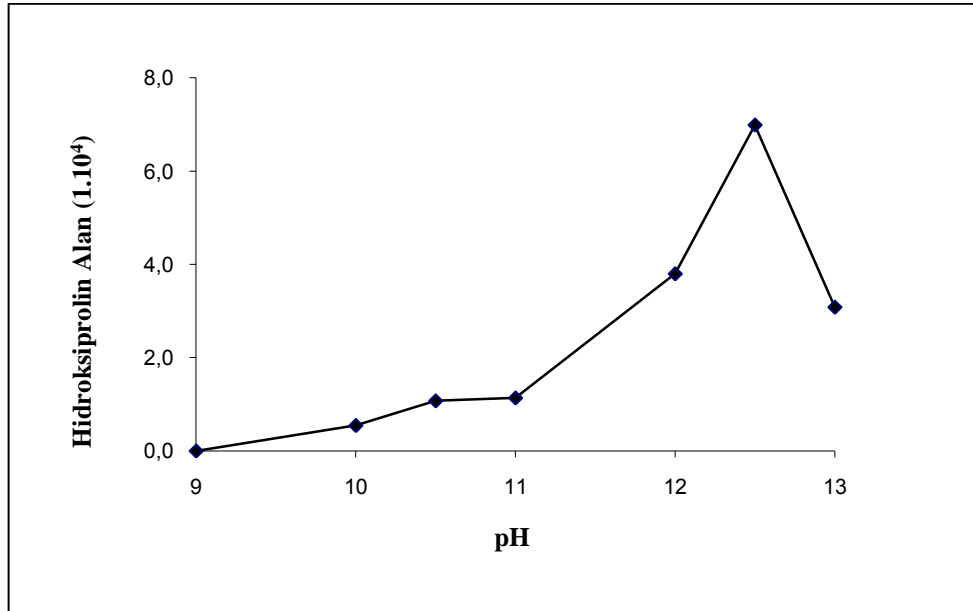
Literatür bilgilerine göre ultraviyole dedektör kullanılarak yapılan çalışmalarda en uygun türevleme pH değerinin 9,0- 9,7 aralığında değiştiği görülmüştür. Bu çalışmalarda pH değerinin oldukça etkili olduğu ve çok az aralıklarda bile farklandığı görülmüştür (Paroni ve diğ., 1992). Bu nedenle ultraviyole dedektörle yapılacak olan tayin için türevlemenin yapıldığı pH değerleri 8,9; 9,1; 9,3; 9,5; 9,7 olarak seçilmiştir. 50 µL idrar örneği ve 10 mg/L derişimde 50 µL hidroksiprolin içeren çözeltiye yapılan işlemlerin ardından, 20 dakika boyunca ve 90 °C sıcaklıkta türevleme yapıldı. Şekil 3.5'de pH değerlerinin elde edilen alanlara etkisi gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarda en iyi türevlemenin gözleendiği pH değeri 9,5 olarak belirlenmiş ve daha sonraki çalışmalarda ve hidroksiprolin tayinlerinde örnekler bu pH değerinde türevlendirilmiştir.

Literatür bilgilerine göre ultraviyole dedektör kullanılarak yapılan çalışmalarda en uygun türevleme pH değerinin 9,0- 13 aralığında değiştiği görülmüştür. pH 9 değerinin altında türevleme gözlenmediği daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Hidroksiprolinin için kullanılan türevleme ajanı ve elektrokimyasal dedektörle yapılan ölçümlerde uygun pH değeri çok yüksek verim farklılıkları oluşturur (Welch ve diğ., 1992). Bu nedenle bu çalışmada da pH taramasına 9'dan başlanarak yapıldı. Elektrokimyasal dedektörle yapılacak olan tayin için türevlemenin yapıldığı pH değerleri 9; 10; 10,5; 11; 12; 12,5; 13'tür. 50 µL idrar ve 50 µL 25 mg/L derişimde hidroksiprolin içeren çözeltiye yapılan işlemlerin ardından, 10 dakika boyunca ve 80 °C sıcaklıkta türevleme yapıldı. Şekil 3.6'de farklı pH değerleri uygulandığında alınan sonuçlar gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarda en iyi türevlemenin gözleendiği pH değeri

12,5 olarak bulundu ve daha sonraki çalışmalarda ve hidrokspirolin tayinlerde bu pH değerinde türevleme yapıldı.



Şekil 3.5. Ultraviyole dedektörle yapılan ölçümlerde türevleme pH'sinin hidrokspirolin alanı/ iç standart alanı oranına etkisi.



Şekil 3.6. Elektrokimyasal dedektörle yapılan ölçümlerde türevleme sıcaklığının hidrokspirolin alanına etkisi.

3.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Tayin Şartları

Ultraviyole dedektör ile yapılan çalışma için tayin şartları;

Kolon : Waters C18 3,5 µm, 4,6 x 150 mm

Hareketli Faz : Asetonitril- asetat tamponu (20:80, v/v), 1,3 mL/dakika akış hızı

Dedektör : UV Görünür Bölge

UV Dalga boyu : 360 nm

Hareketli faz olarak (%20/80, v/v) asetonitril: fosfat tampon karışımı kullanılmıştır. pH değeri 5,0 M'lık hidroklorik asit kullanılarak 4,3'e ayarlanmıştır. Akış hızı dakikada 1,3 mL olarak belirlenmiş olup, hareketli fazın kolona yaptığı basınç 80-100 bar aralığında değişmiştir.

Elektrokimyasal dedektör ile yapılan çalışma için tayin şartları;

Kolon : Waters C18 3,5 µm, 4,6 x 150 mm

Hareketli Faz : Metanol- sodyum fosfat tamponu (%17:83, v/v), 1 mL/dakika akış hızı

Dedektör : Elektrokimyasal

Analitik Hücre : dedektör 1: +350 mV / dedektör 2: +640 mV

Hareketli faz olarak (%17/83, v/v), metanol- sodyum fosfat tampon karışımı kullanılmıştır. pH değeri derişik fosforik asit kullanılarak 3,4 ayarlanmıştır. Akış hızı dakikada 1 mL olarak belirlenmiş olup, hareketli fazın kolona yaptığı basınç 120-150 bar aralığında değişmiştir.

Hem ultraviyole dedektörle hem de elektrokimyasal dedektörle yapılan ölçümlerde 150 mm uzunluğunda 4 µm çap ve 3,9 mm kalınlığında, dolgu materyali silika bazlı C18 NovaPak Waters marka kolon kullanılmıştır. Küresel yapılı olan kolon dolgu malzemesinin gözenek açıklığı 6 nm, ortalama yüzey alanı 120 m²/g, ortalama gözenek hacmi 0,3 mL/g'dır. Literatürde idrarda hidroksiprolin tayininde sıklıkla bu kolon kullanıldığı için bu tez çalışmasında bu kolon tercih edilmiştir (Reed ve diğ., 1991, Stratford ve diğ., 1990).

Pompa izokrotik olup tek yönlü akış sağlamaktadır. Tüm çalışmalarda HPLC cihazı oda sıcaklığında çalıştırılmıştır. Agilent 1100 Serisi HPLC cihazında Rheodyne marka 20 µL sarmal hacmine sahip enjektör bölümü kullanılmıştır.

Hidroksiprolin için yapılan tüm çalışmalarda örnekler deneylerle belirlenmiş olan en uygun türevleme koşullarında hazırlanarak, verilmiş olan şartlarda tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Kreatinin için idrar örneği 200 kat seyreltilmiş pH 2,2 değerine kadar asitlendirilmiş ve C18 kolonu ile 235 nm dalga boyunda ultraviyole dedektörle analizi yapılmıştır. Hareketli faz olarak da pH değeri 7,4 olan 0,05 M fosfat tamponu kullanılmıştır. Hareketli fazın akış hızı 1 mL/dakika olarak ayarlanmıştır (Jen ve diğ., 2002).

3.3 Hidroksiprolin için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisindeki Bulgular

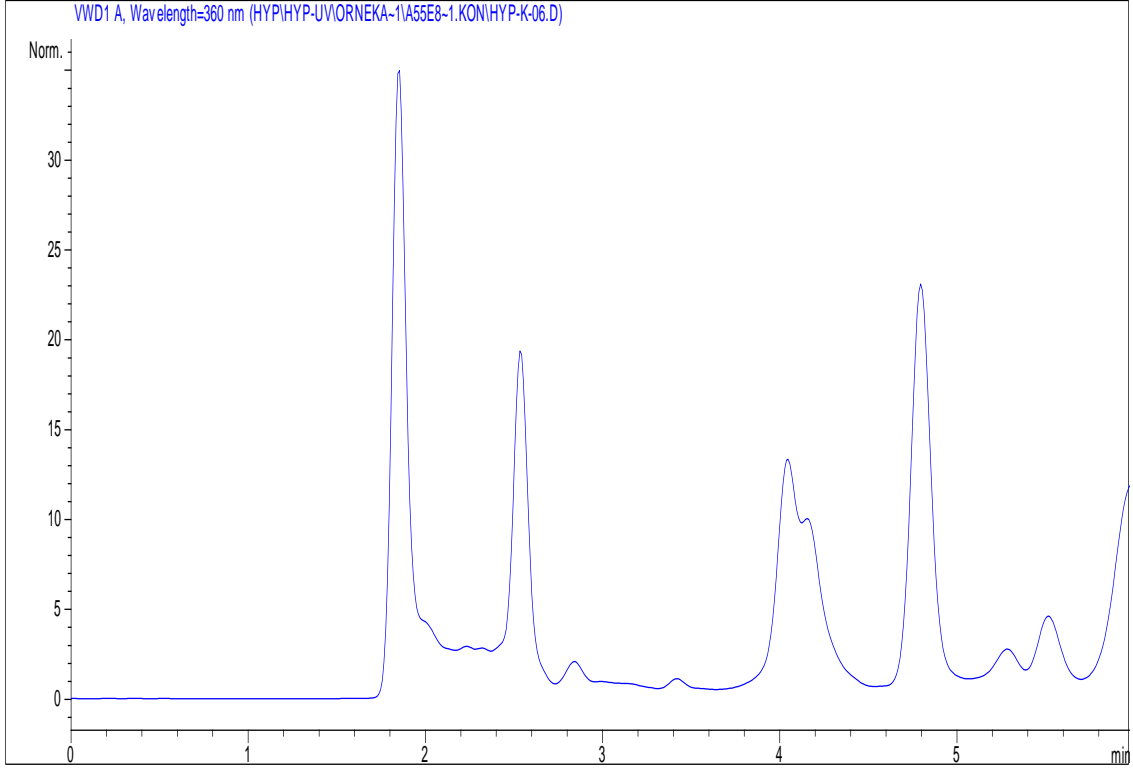
Ultraviyole dedektörle yapılacak olan tayinlerde 50 µL idrar örneği, 250 µL iç standart olarak seçilen 40 mg/L sisteik asit ve 50 µL 25 mg/L hidroksiprolin standart çözeltileri uygun şartlarda hazırlandıktan sonra HPLC sistemine verildi. Tayinler esnasında iç standart olarak kullanılan sisteik asit ve hidroksiprolin ait kromatogram Şekil 3.7'de, kromatogram sonuçlarına göre bulunan alıkonma süreleri de Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Ultraviyole dedektörle elde edilen kromatogramda 2,6 dakikada iç standart olarak kullanılan sisteik asite ait olan pik, 4,6 dakikada ise hidroksiprolin ait olan pik elde edilmiştir. Şekil 3.7'de verilen kromatogram idrar örneği ortamında alınması dolayısıyla kromatogramda diğer bileşenlere ait piklerde yer almaktadır ama hidroksiprolin ve iç standart piklerini etkilemedikleri için olumsuzluk oluşturmamışlardır. Hidroksiprolin ve sisteik asitin alıkonma sürelerinin bulunabilmesi için artan derişimlerde ve 500 mg/L gibi yüksek derişimde hidroksiprolin ve 200 mg/L derişimde sisteik asit idrar örneklerine ilave edilmiş ve her iki türe ait cihaza verilerek alıkonma süreleri tayin edilmiştir.

Elektrokimyasal dedektörle yapılacak olan tayin için 50 µL idrar ve 50 µL 25 mg/L hidroksiprolin standart çözeltileri uygun şartlarda hazırlandıktan sonra HPLC sistemine verildi. Şekil 3.8'de Hidroksiprolin standardının (3,2 dakika) elektrokimyasal dedektörle ölçümünün kromatogramı verilmiştir. Ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör kullanılarak belirlenen en uygun şartlar Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Ultraviyole dedektörle tayin edilen sisteik asit ve hidroksiprolinin alıkonma süreleri

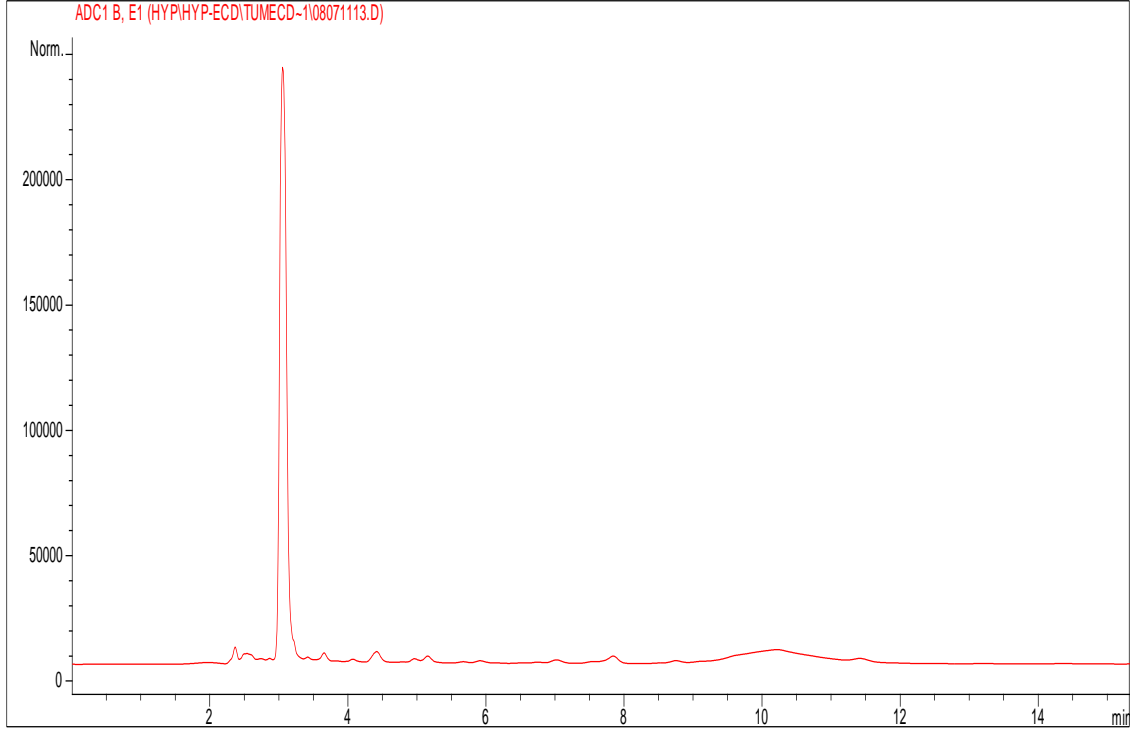
Madde	Alıkonma süresi (dakika)
Hidroksiprolin	4,6
Sisteik asit	2,6



Şekil 3.7. Sisteik asit ve hidroksiprolin içeren idrar örneğine ait ultraviyole dedektörle elde edilmiş kromatogram.

Çizelge 3.2. Ultraviyole ve elektrokimyasal dedektörle tayin edilen hidroksiprolin için belirlenen en uygun şartlar.

Dedektör	Türevleme süresi (dakika)	Türevleme sıcaklığı (°C)	Türevleme pH	Alıkonma süresi (dakika)
Ultraviyole dedektör	20	90	9,5	4,6
Elektrokimyasal dedektör	10	80	12,5	3,2

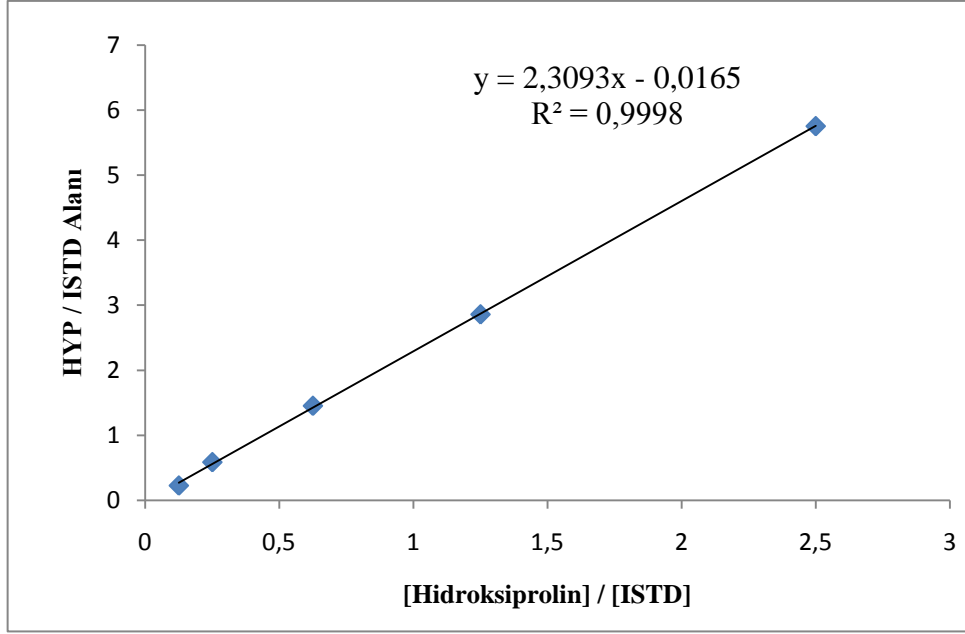


Şekil 3.8. Hidroksiprolin içeren idrar örneğine ait elektrokimyasal dedektörle elde edilmiş kromatogram.

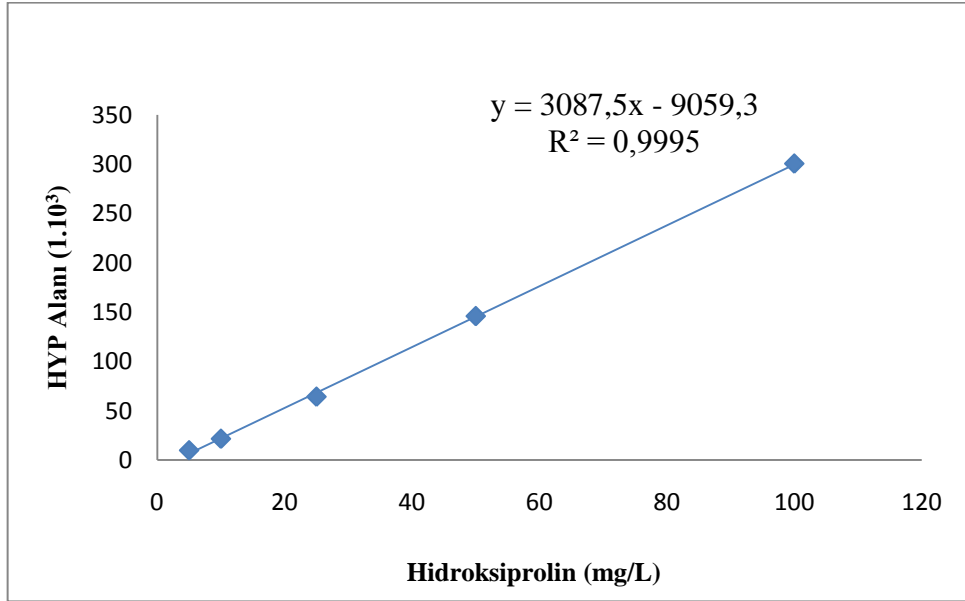
3.3.1 Doğrusallık Bulguları

Doğrusallık için beş farklı kişinin idrarları karıştırılarak oluşturulan havuzdan alınan idrarlara 5,00; 10,0; 25,0; 50,0; 100 mg/L derişimlerde olacak şekilde hidroksiprolin eklenerek kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Standart katma yöntemi kullanılmasının nedeni idrar tayininde zengin matriksten dolayı oluşabilecek hataları en aza indirmektir. Çalışılan hidroksiprolin derişimleri ultraviyole dedektörle yapılan tayinlerde ve elektrokimyasal dedektörle yapılan tayinlerde aynıdır. Şekil 3.9'da ultraviyole dedektörle analizlenen çözeltilere ait hidroksiprolin pik alanının iç standart pik alanı oranına karşı hidroksiprolin derişiminin iç standart derişimine oranı grafiği verilmiştir. Şekil 3.10'da ise hidroksiprolin derişimine karşı hidroksiprolin eklenmiş çözelti sinyallerinin alanları gösterilmiştir.

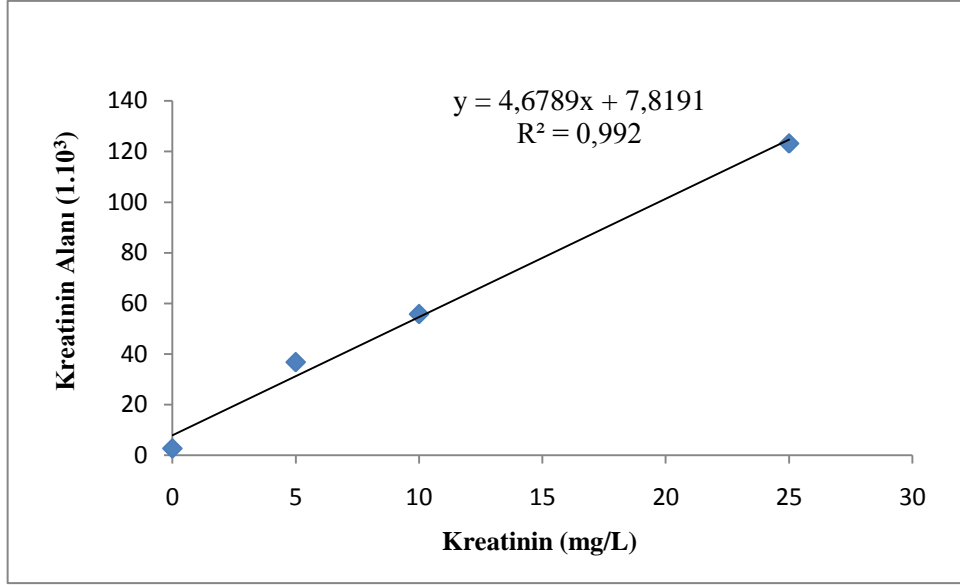
Ultraviyole dedektör ve elektrokimyasal dedektör sonuçları ile çizilen her iki grafik içinde R^2 değerleri 1'e yakındır. Çalışılan aralıkta hidroksiprolin derişimi ile alınan sinyaller doğrusaldır. Kontrol grubu ve maruz gruptan alınan her bir idrar örneğinin hidroksiprolin derişimi bu kalibrasyon grafikleri kullanılarak bulunmuştur.



Şekil 3.9. Ultraviyole dedektörle tayinde 20 dakika, 90 °C’de ve pH 9,5 de türevlenmiş örneklerde iç standarda oranlanmış hidroksiprolin derişimi - alan grafiği.



Şekil 3.10. Elektrokimyasal dedektörle 10 dakika, 80 °C’de ve pH 12,5 de türevlenmiş örneklerde hidroksiprolin derişimi – alan grafiği.



Şekil 3.11. Ultraviyole dedektörle kreatinin derişim- alan grafiği.

Şekil 3.11’de ise kreatinin derişimlerine karşılık kreatinin sinyalinin alan grafiği çizilerek standart grafiği çizilmiştir. Doğrusallık için beş farklı kişinin idrarları karıştırılarak oluşturulan havuzdan alınan idrarlara 5,00, 10,0, 25,0 mg/L derişimlerde olacak şekilde kreatinin eklenerek kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

3.3.2 Tekrarlanabilirlik Bulguları

Hem yöntemin gün içi ve günler arası hem de cihazın gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliği ultraviyole ve elektrokimyasal dedektörler kullanılarak toplam sekiz adet tekrarlanabilirlik çalışması yapılmıştır.

Gün içi yöntem tekrarlanabilirliğinde, ultraviyole dedektörle yapılan tayinler için sigara içmeyen beş kişinin idrarları karıştırılarak oluşturulan idrar havuzundan eşit hacimde alınan idrarlara 5,00, 25,0, 100 mg/L olacak şekilde hidrokspirolin ilave edilmiştir. Her bir derişim için 3 tekrar yapılmış ve bu örnekler Çizelge 3.2’de özetlenen şartlarda türevlemeye tabi tutulmuşlardır. Elde edilen sonuçların ortalama, standart sapma (SD) ve yüzde bağıl standart sapmalarını (% RSD) Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Elektrokimyasal dedektörle yapılan tayinlerin gün içi yöntem tekrarlanabilirliği için yine aynı idrar havuzundan eşit hacimde alınan idrara 5,0, 25,0, 100 mg/L olacak

şekilde hidroksiprolin derişimlerinin eklenmiştir. Her bir derişim için hazırlanan 3 farklı örneğe Çizelge 3,2’de özetlenen şartlarda türevleme işlemleri uygulanmış ve elde edilen sonuçlardan elde edilen ortalama, standart sapma (SD) ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD) de Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Günler arası yöntem tekrarlanabilirliği için, hem ultraviyole hemde elektrokimyasal dedektörle tayini yapılan yöntemlerde, arka arkaya takip eden 5 ayrı günde idrar havuzundan eşit hacimde alınan idrarlara 5,00; 25,0; 100 mg/L derişimlerde hidroksiprolin standartları eklenerek Çizelge 3.2’deki şartlarda türevlemeye tabi tutulmuşlardır. Örnekler hazırlandığı günlerde analiz edilmiş ve elde edilen sonuçların ortalama, SD ve %RSD değerleri Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör kullanılarak yapılan hidroksiprolin tayinlerinde gün içi yöntem tekrarlanabilirliği ölçümlerinde; ortalama, standart sapma ve yüzde bağıl standart sapma değerleri.

Dedektör	Eklenen hidroksiprolin derişimi (mg/L)	Gözlenen hidroksiprolin derişimi* (ortalama±SD) mg/L	Yüzde Bağıl standart sapma (%RSD)
Ultraviyole dedektör	5	5,6 ± 0,3	5,4
	25	26 ± 1	4,2
	100	101 ± 4	4,0
Elektrokimyasal dedektör	5	5,5 ± 0,6	10,9
	25	25 ± 3	9,8
	100	108 ± 4	4,0

*N= 3

Gün içi cihaz tekrarlanabilirliği için her iki dedektörle yapılan tayinlerde aynı idrar havuzundan eşit hacimde alınan örneklere 5,00, 25,0 , 100 mg/L derişimlerde hidroksiprolin ilave edilmiştir. Çizelge 3.2’de özetlenen şartlarda türevleme yapılmıştır. Her derişim için hazırlanıp işlemleri tamamlanmış örnekler aynı gün içerisinde beşer

defa analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların ortalama, standart sapma ve yüzde bağıl standart sapmalarını Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör kullanılarak yapılan hidroksiprolin tayinlerinde günler arası yöntem tekrarlanabilirliği ölçümlerinde; ortalama, standart sapma ve yüzde bağıl standart sapma değerleri.

Dedektör	Eklenen hidroksiprolin derişimi (mg/L)	Gözlenen hidroksiprolin derişimi* (ortalama±SD) mg/L	Yüzde Bağıl standart sapma (%RSD)
Ultraviyole dedektör	5	5,6 ± 0,3	5,4
	25	26,6 ± 1,3	4,9
	100	100 ± 5	4,7
Elektrokimyasal dedektör	5	5,6 ± 0,5	8,9
	25	26 ± 2	6,5
	100	108 ± 5	4,9

*N=5

Çizelge 3.5. Ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör kullanılarak yapılan hidroksiprolin tayinlerinde gün içi cihaz tekrarlanabilirliği ölçümlerinde; ortalama, standart sapma ve yüzde bağıl standart sapma değerleri.

Dedektör	Eklenen hidroksiprolin derişimi (mg/L)	Gözlenen hidroksiprolin derişimi* (ortalama±SD) mg/L	Yüzde Bağıl standart sapma (%RSD)
Ultraviyole dedektör	5	5,6 ± 0,4	7,1
	25	26,2 ± 0,5	1,9
	100	103 ± 4	3,6
Elektrokimyasal dedektör	5	5,7 ± 0,2	3,5
	25	29,3 ± 0,5	1,7
	100	106 ± 4	3,7

*N= 5

Çizelge 3.6. Ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör kullanılarak yapılan hidroksiprolin tayinlerinde günler arası cihaz tekrarlanabilirliği ölçümlerinde; ortalama, standart sapma ve yüzde bağıl standart sapma değerleri.

Dedektör	Eklenen hidroksiprolin derişimi (mg/L)	Gözlenen hidroksiprolin derişimi* (ortalama±SD) mg/L	Yüzde Bağıl standart sapma (%RSD)
Ultraviyole dedektör	5	5,5 ± 0,2	3,6
	25	26,8 ± 1,1	4,1
	100	103 ± 6	6,1
Elektrokimyasal dedektör	5	5,8 ± 0,2	3,4
	25	26,4 ± 1,4	5,3
	100	105 ± 6	5,5

*N= 5

Günler arası cihaz tekrarlanabilirliği için 5,00, 25,0, 100 mg/L'lik hidroksiprolin derişimlerinin aynı idrar havuzundan alınan eşit hacimdeki idrara eklenmesiyle oluşturulan ve her derişim için çizelge 3.2'de belirtilen şartlarda türevlemenin yapıldığı örnekler arka arkaya takip eden beş ayrı günde analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların ortalama, SD, %RSD değerleri Çizelge 3.6'da verilmiştir.

3.3.3 Geri Kazanım Bulguları

Hem ultraviyole dedektör için geliştirilen hem de elektrokimyasal dedektör için geliştirilen yöntemler kullanılarak gerçek örnek ortamına ilave edilen hidroksiprolin için geri kazanım verimleri araştırıldı. Bu çalışma için beş kişinin idrar havuzundan alınan eşit miktardaki idrar örneğine 100 mg/L derişimde hidroksiprolin eklendi. Çizelge 3.2'de verilen şartlar örneklere uygulandı ve ultraviyole ve elektrokimyasal dedektörlerle HPLC'de analiz edildi. 5 tekrarlı uygulananan çalışma sonucunda elde edilen geri kazanım verileri ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör için Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Hidroksiprolinin ultraviyole dedektörle ölçüldüğü yöntem için geri kazanım değerleri.

Analit	İlave edilen derişim (mg/L)	Geri kazanım (%) \pm SD	
		Ultraviyole dedektörün kullanıldığı yöntem	Elektrokimyasal dedektörün kullanıldığı yöntem
Hidroksiprolin	100	108 \pm 6	102 \pm 7

3.3.4 Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Sınırı

Beş kişinin idrarları karıştırılarak oluşturulan idrar havuzundan alınan 50 μ L, kalibrasyon grafiği çiziminde kullanılan en küçük derişimin yarısı olan 2,5 mg/L derişimde hidroksiprolinin 50 μ L'sine eklenmiştir. 10 ayrı örnek, Çizelge 3.2'de verilen şartlarda hem ultraviyole hem de elektrokimyasal dedektörün kullanıldığı yöntemler için ayrı ayrı hazırlanarak HPLC'de analiz edilmiştir. Sonuçların standart sapmasının 3 katına karşılık gelen derişim LOD ve 10 katına karşılık gelen derişim LOQ olarak hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. Hidroksiprolinin ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör kullanılarak HPLC ile tayininde belirlenen LOD ve LOQ değerleri.

Yöntem	LOQ (mg/L)	LOD (mg/L)
Ultraviyole dedektörlü	5,3	1,8
Elektrokimyasal dedektörlü	2,9	0,9

Sağlıklı tayinler için en az tayin sınırı kadar bir derişim gerekir. Bizim kullandığımız kontrol ve maruz grubun örneklerindeki hidroksiprolin derişimleri de bu sınırın üzerindedir. Ayrıca elektrokimyasal dedektörün daha düşük derişimleri tayin edebildiği dolayısıyla daha duyarlı olduğu söylenebilir. Ultraviyole dedektörle elde edilen gözlenebilme sınırı sonucu literatürdeki çalışmalardan daha düşüktür. (Paroni ve diğ., 1992; Mazzi ve diğ., 1996). Elektrokimyasal dedektörle bulunan gözlenebilme

sınırı ise hem ultraviyole dedektörle bulunan değerden hem de literatürdeki değerlerden düşüktür (Husek ve diğ., 2002; Lin ve Kuan, 2010) .

3.4 Kontrol ve Maruz Gruplarından Alınan İdrar Örneklerinin Tayinleri

Kırıkkale Hacı Hidayet Doğruer Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi çalışanlarından sigara içmeyen ve pasif içici olmayan 24 kişinin idrarları toplandı. Bu idrar örnekleri kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Aynı hastanede çalışan ve günde en az bir paket (20 adet) sigara kullanan 24 kişinin idrarları alındı. Bu grup ise maruz grubumuzu oluşturmuştur. Örnekleri 34-739 karar numarası 25/07/2011 tarihle, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Etik Kurulundan alınan yasal izin ile toplanmış ve analiz edilmiştir. Toplanan tüm örnekler soğuk zincir gözetilerek iki saat içerisinde laboratuvara getirilmiş ve bekletilmeden önce kontrol grubu idrar örneklerinin ardından maruz grubun örnekleri analiz edilmiştir.

Sigara içen maruz grubun idrarları ile kontrol grubunun idrarlarının analiz sonuçlarının karşılaştırılması yanında, iki farklı dedektör kullanılarak farklı yöntemlerle tayin gerçekleştirildiğinden iki sonuç verilmiştir.

Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da verilen kalibrasyon eğrileri kullanılarak maruziyet ve kontrol grubuna ait idrar örneklerinde hidrokspirolin miktarlar tayin edilmiştir. Çizelge 3.9'da kontrol grubunda bulunan kişilerin herbirinin idrarında bulunan hidrokspirolin değerleri Çizelge 3.10'da ise sigara içen grupta bulunan her bir kişinin idrar örneğindeki hidrokspirolin değerleri maruz grubunkiler olarak verilmiştir.

Ayrıca her iki çizelgedede her bir idrar örneğinde bulunan kreatinin derişimlerine ait analiz sonuçları verilmiştir. Böbrek fonksiyonlarını değerlendirmede ve glomerüler filtrasyon oranını göstermesi açısından kreatinin önemlidir. Glomerüler filtrasyon hızının doğrudan ölçümü çok güç olduğundan, yerine çeşitli maddelerinkandan temizlenme hızı demek olan klirens hesabı yardımıyla dolaylı yoldan hesaplanır. Klirens ölçümü için kullanılacak olan ideal bir madde; dolaşımında serbestçe bulunmalı, glomerüler bazal membrandan serbestçe filtre olmalı, nefron boyunca sekrete edilmemeli ve geri emilmemeli, sabit hızda endojen üretilmeli ve kolaylıkla ölçülebilir olmalıdır. En sık kullanılan yöntem kreatinin klirensidir. Bu nedenle biz de

her bir idrar örneğinde bulunan kreatinin miktarından [hidroksiprolin]/[kreatinin] oranını bularak kreatinin klirensini hesaba katmış olduk.

Çizelge 3.9. Sigara içmeyen kontrol grubunun idrar örnek sonuçları.

KONTROL GRUBU		UV		EC	
No	Kreatinin (mg/L)	Hidroksiprolin (mg/L)	Hyp/ Kreatinin	Hidroksiprolin (mg/L)	Hyp/ Kreatinin
1	23,1	Pik görülmedi	*	Pik görülmedi	*
2	41,1	39,9	1,0	38,2	0,9
3	36,4	42,2	1,2	45,5	1,3
4	40,4	43,8	1,1	42,0	1,0
5	30,2	32,8	1,1	30,5	1,0
6	29,7	43,0	1,5	45,5	1,5
7	13,9	25,3	1,8	25,8	1,9
8	22,5	42,6	1,9	45,3	2,0
9	34,3	42,5	1,2	41,3	1,2
10	25,6	44,6	1,7	44,5	1,7
11	36,9	43,2	1,2	38,4	1,0
12	28,6	45,2	1,6	43,2	1,5
13	27,4	61,2	2,2	58,6	2,1
14	16,5	20,3	1,2	19,3	2,0
15	51,5	71,0	1,4	68,5	1,3
16	79,1	55,6	0,7	60,0	0,8
17	56,2	27,2	0,5	30,8	0,6
18	24,5	38,3	1,6	40,4	1,7
19	29,9	26,9	0,9	28,1	0,9
20	12,4	13,7	1,1	12,8	1,0
21	40,3	35,9	0,9	36,4	0,9
22	14,4	27,6	1,9	25,2	1,8
23	30,0	17,2	0,6	20,0	0,7
24	17,5	43,8	2,5	45,6	2,6
Ortalama	31,8	36,8	1,33	36,9	1,33

*=Hesaplanamadı

Sonuçların istatistiksel tayininde ilk önce SPSS’te bağımlı iki örnek t testi yapıldı ve aynı idrar örneğine ait hem ultraviyole dedektörle hem de elektrokimyasal dedektörle yapılan hidroksprolin tayin sonuçları arasındaki ilişki incelendi. Kontrol grubu idrar örneklerindeki hidroksprolin derişimleri için yapılan uygulamada olasılık (p) değeri 0,867 bulundu ve %95 güven aralığında farklı dedektörlerle yapılan tayinlerde söz konusu değeri 0,05’den büyük olduğu için, iki dedektör arasındaki fark $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı değildir. Maruz grubunda da yine şekilde aynı idrar örneğinin farklı dedektörlerle tayinleri karşılaştırıldı, olasılık değeri 0,367 bulundu ve söz konusu değeri 0,05’den büyük olduğu için, iki dedektör arasındaki fark $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu da idrar örneğinde bulunan hidroksprolin derişimini %95 güven aralığında her iki dedektörün aynı ölçtüğünü gösterir.

Kontrol ve maruz grubunun örneklerine ise SPSS’te bağımsız iki örnek t testi uygulandı. Kontrol ve maruz grubun idrarları ultraviyole dedektör kullanılarak tayini yapıldı ve olasılık değeri 0,018 bulundu, %95 güven aralığında söz konusu değeri 0,05’den küçük olduğu için, kontrol ve maruz grup arasındaki ilişkinin $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğunu söyleyebiliriz. Aynı şekilde elektrokimyasal dedektörle yapılan hem kontrol hem de maruz grubun tayini sonuçlarının istatistiksel tayininde de olasılık 0,035 olarak bulunmuş ve söz konusu değeri 0,05’den küçük olduğu için kontrol ve maruz grubun arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bu dedektör içinde söz konusudur. Bu da sigara içen ve içmeyen grubun idrarlarındaki hidroksprolin derişiminin %95 güven aralığında farklı olduğunu gösterir.

Kreatinin, kontrol ve maruz grubunda tayin sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması da SPSS’te bağımsız t testi ile yapıldı. %95 güven aralığında olasılık değeri 0,753 bulundu. Söz konusu değeri 0,05’den büyük olduğu için, $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak kreatinin düzeyleri arasında anlamlı bir fark yoktur.

İstatistiki değerlendirmeler ayrıca $S_{\text{birleşik}}$ ve belirli bir güven seviyesi için hesaplanan t değerleri bulunarak da yapılmıştır. Ultraviyole dedektörle yapılan çalışmada sigara içen ve içmeyen bireylerin istatistiki değerlendirmesinde $S_{\text{birleşik}}$ 0,74; t değeri 2,38 olarak bulunmuştur. Elektrokimyasal dedektörle yapılan çalışmada sigara içen ve içmeyen bireylerin istatistiki değerlendirmesinde $S_{\text{birleşik}}$ 0,73; t değeri 2,31 olarak bulunmuştur. %95 güven seviyesinde t için kritik değeri 2,02 ve her iki bulunan

değer de >2,02 olduğu için sigara içen ve içmeyen bireylerin idrarlarındaki hidroksiprolin düzeyleri arasında anlamlı bir fark vardır.

Çizelge 3.10. Sigara içen maruz grubunun idrar örnek sonuçları.

MARUZ GRUBU		UV		EC	
No	Kreatinin (mg/L)	Hidroksiprolin (mg/L)	Hyp/ Kreatinin	Hidroksiprolin (mg/L)	Hyp/ Kreatinin
1	23,6	25,9	1,1	25,0	1,1
2	44,6	24,1	0,5	26,7	0,6
3	40,3	61,2	1,5	64,5	1,6
4	31,4	56,5	1,8	54,3	1,7
5	23,1	34,4	1,5	32,3	1,4
6	15,3	44,0	2,9	42,0	2,7
7	29,2	19,0	0,7	17,0	0,6
8	30,4	45,6	1,5	43,8	1,4
9	46,8	73,0	1,6	73,5	1,6
10	26,6	31,3	1,2	30,8	1,2
11	33,0	42,6	1,3	44,6	1,4
12	53,6	50,4	0,9	48,2	0,9
13	7,8	26,8	3,4	28,8	3,7
14	34,8	47,3	1,4	44,9	1,3
15	40,3	80,6	2,0	86,3	2,1
16	21,9	51,0	2,3	53,7	2,5
17	15,3	38,7	2,5	36,6	2,4
18	11,7	19,9	1,7	24,0	2,0
19	30,5	60,4	2,0	57,3	1,9
20	19,6	67,2	3,4	65,3	3,3
21	25,4	58,4	2,3	55,7	2,2
22	5,9	21,1	3,6	19,3	3,3
23	52,1	32,8	0,6	39,1	0,8
24	66,1	82,6	1,3	76,7	1,2
Ortalama	30,4	45,6	1,79	45,4	1,77

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsanlarda vücut kollajeninin çoğu kemiklerde bulunur (Bornstain ve Traub, 1979). Kollajenin içerisindeki amino asitlerin ise % 14'ünü, protein sentezinden sonra prolinin hidroksillenmesiyle oluşan hidroksiprolin oluşturur (Scriver, 1983). Hidroksiprolin, kollajen dokunun yıkımından sonra tekrar yapıya katılmaz ve idrarla atılır. Bu sebeple hidroksiprolin, kollajen metabolizmasını ifade eden bir göstergedir (Prockop ve Kivirikko, 1967). İdrardaki hidroksiprolinin ölçümü birçok hastalığın teşhisi, izlenmesi ve tedavisinde de yarar sağlar. Bu hastalıklara örnek olarak osteoporoz (Endres ve Rude, 1994), paget hastalığı (Scriver, 1983), kanser (Hopkins ve diğ., 1984), fibrozis (Garcia ve diğ., 2002), deri hastalıkları (Kakinuma ve diğ., 2005) verilebilir. Ayrıca yapısal bir gösterge olması nedeniyle de idrarda hidroksiprolin tayini büyük önem taşır.

4-hidroksiprolinin biyolojik materyalde tayini amacıyla birçok analitik yöntem geliştirilmiş ve yayınlanmıştır (Woessner, 1961; Chu ve diğ., 1997; Euli ve diğ., 1999). Bu çalışmada ise Paroni ve Welch'in 1992 ve 1995 yıllarında yaptıkları çalışmalar temel alınmış ve özellikle türevleme basamağındaki şartlarda değişiklikler yapılmıştır. Belirlenen en uygun şartlarda, sigara içen maruz grup ve içmeyen kontrol grubu idrarlarındaki hidroksiprolin düzeyleri iki farklı dedektörle tayin edilmiştir. Bu sayede hem dedektörlerin hem de sigara içen ve içmeyen grupların hidroksiprolin tayin sonuçlarının karşılaştırılmaları yapılmıştır.

Analitin, biyolojik materyalden izolasyonu sonrasında gerçekleştirilen türevleme işlemi bu tür çalışmalarda öncelikli derecede önem taşıyan bir basamaktır. Çünkü türevlemenin yapıldığı pH, sıcaklık ve süre, hidroksiprolin analizinin sonucunu oldukça fazla etkiler. Ultraviyole dedektörle yapılan tayinler için türevlemenin yapıldığı en uygun koşullar 90 °C, pH değeri 9,5 ve türevleme süresi 20 dakika olarak saptanmıştır. Elektrokimyasal dedektörle yapılan tayinler için ise türevlemenin yapıldığı en uygun koşullar 80 °C, pH değeri 12,5 ve türevleme süresi 10 dakika olarak bulunmuştur. Sigara içen maruz grup ve sigara içmeyen kontrol grubunun idrarlarındaki hidroksiprolin tayinleri belirtilen en uygun koşullarda yapılmıştır.

Ultraviyole dedektörle yapılan kantitatif tayin için çizilen kalibrasyon eğrisi 5,00 – 100 mg/L arasında hazırlanmış, örneklerin içerisindeki hidroksiprolin derişimi de bu aralık arasında bulunmuştur. Korelasyon katsayısı 0,9998 olarak elde edilmiştir. 100

mg/L standart ilavesi ile yapılan çalışmalarda geri kazanım verimi (%geri kazanım \pm standart sapma) 108 ± 6 olarak bulunmuştur. Ultraviyole dedektörün kullanıldığı çalışmalarda yöntemin tespit edebileceği en küçük derişim (LOD) 1,8 mg/L, tayin edebileceği en küçük derişim (LOQ) ise 5,3 mg/L olarak bulunmuştur.

Elektrokimyasal dedektörle yapılan kantitatif tayin için çizilen kalibrasyon eğrisi de 5,00 – 100 mg/L arasında hazırlanmış, korelasyon katsayısı 0,9995 olarak elde edilmiştir. 100 mg/L standart ilavesi ile yapılan çalışmalarda geri kazanım verimi (%geri kazanım \pm standart sapma) 102 ± 7 olarak bulunmuştur. Elektrokimyasal dedektörün kullanıldığı çalışmalarda yöntemin tespit edebileceği en küçük derişim 0,9 mg/L, tayin edebileceği en küçük derişim ise 2,9 mg/L olarak bulunmuştur. Bu sonuçlarla elektrokimyasal dedektörün, ultraviyole dedektöre göre daha düşük hidroksiprolin derişimlerini tayin edebildiği söylenebilir.

Literatürde, hidroksiprolin tayini için HPLC cihazı kullanılarak iki farklı dedektörle karşılaştırılmalı yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda sigara içen (n=24) ve sigara içmeyen (n=24) toplam 48 gönüllüye ait idrar örneklerinin hidroksiprolin düzeyleri, HPLC cihazında kromatografik olarak ayrıldıktan sonra, ultraviyole ve elektrokimyasal dedektörle tayin edilmiştir. İdrar kreatinin düzeyleri de ölçülerek ve elde edilen hidroksiprolin değerlerinin kreatinin klerensi hesaplaması her iki dedektörle elde edilen sonuçlara uygulanarak, istatistiki değerlendirmeler SPSS 16'da yapılmıştır.

Aynı idrar örneğine ait hidroksiprolin düzeyine her iki dedektörle bakıldığından sonuçlara bağımlı t-testi uygulanmıştır. İki farklı dedektörle bulunan sonuçlar arasında önemli bir fark (%95 güvenilirlik aralığında) bulunamamıştır. Elde edilen bu sonuç dedektörlerin aynı idrar örneğindeki hidroksiprolin düzeyini belli bir güven aralığında aynı ölçtüğünü gösterdiğinden bu istatistik, dedektörlerin buldukları sonuçların doğru olduğunu destekler. Sigara içen ve içmeyen bireylerin idrarlarındaki hidroksiprolin düzeyleri arasındaki fark ise, SPSS'te bağımsız t-testi ile (%95 güvenilirlik aralığında) incelenmiş ve her iki dedektörle de aralarında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. İstatistiksel olarak elde edilen bu fark, sigara içiminin idrardaki hidroksiprolin derişimini arttırdığını gösterir. Bu şekilde hem dedektörlerin karşılaştırılması, hem de sigara içiminin hidroksiproline etkisi incelenmiştir. Hidroksiprolinin düzeyinin kreatinin düzeyine oranının cinsiyete göre değişmediği belirlendiğinden, tez çalışmamızda

cinsiyet dikkate alınmamıştır (Teerlink ve diğ., 1989). Özellikle akciğer hastalıkları (amfizem, astım, akciğer kanser, v.b.), idrardaki hidroksiprolin seviyesini etkilediği için kontrol ve maruz grubunda bu tür hastalıkların mevcut olmamasına özellikle dikkat edilmiştir.

Tez çalışmamızda sigara içiminin, idrarda hidroksiprolin düzeyini arttırdığı bulunmuştur. Sigara içimi kollajen ve elastin üzerinde kimyasal değişimlere yol açtığından, idrardaki hidroksiprolin düzeyinde de farklılık yaratır (Rickert, 1972; Laurent ve diğ., 1983). Sigara içiminin idrardaki hidroksiprolin derişimini etkileme yolları çeşitli çalışmalarda açıklanmıştır. Bu yollardan bir tanesi sigaranın oksijen ile olan ilişkisine dayanmaktadır. Oksijen, prolinin hidroksiproline hidroksillenmesinde gerekli bir substrattır (Pihlajaniemi ve diğ., 1991). Bu hidroksillenmiş amino asit, kollajenin kararlı üçlü sarmal yapısı içindeki fibrillerin çapraz bağ oluşumu için gereklidir (Wicke, 1995). Sigara içimi de dokulardaki oksijeni azaltacağından bu oluşum olumsuz yönde etkilenecektir (Jensen ve diğ., 1991). Kollajen doku zarar göreceğinden idrarla atılan hidroksiprolin miktarı artacaktır. Diğer yandan sigara birçok biyolojik fonksiyonu etkileyen oksidatif stresi tetikler (Sorensen, 2004). Oksidatif stres, askorbik asit dönüşümünü hızlandırarak bu vitaminin seviyesini düşürür (Faruque ve diğ., 1995). Askorbik asit prolinin enzimatik hidroksilasyonunda kofaktördür. Bu nedenle sigara içiminin askorbik asit düzeyini düşürmesi kollajen sentezinin azalmasına neden olur (Lehninger, 1982). Sigara içenlerin dokularında daha az hidroksiprolin ifade edilir ve daha az kollajen depolanır (Sorensen ve diğ. 2006). Bu nedenlerle sigara içimi ve idrardaki hidroksiprolin derişimi arasında önemli bir bağ vardır.

Bazı çalışmalar sigara kullananların idrarlarında hidroksiprolin düzeyinin arttığını göstermiştir (Kasuga, 1990). Diğer taraftan sigara kullananlar ile kullanmayanların idrar hidroksiprolin düzeyleri arasında fark olmadığını ifade eden çalışmalar da bulunmaktadır. Bu bağlamdaki çalışmalardan birisinde sigara içimi ve idrarda kreatinin derişimi arasında ters orantı olduğu belirtilmiştir. Bu ters orantı idrardaki hidroksiprolinin kreatinine oranının artması demektir (Adlkofer ve diğ., 1982). Oysaki kontrol ve maruz grubunun kreatinin düzeyleri, tezimizde istatistiksel olarak karşılaştırmış ve aralarında anlamlı bir fark olmadığını bulunmuştur. Bulunan sonuç, sigara içiminin idrardaki kreatinin seviyesini değıştirmedini göstermiştir. Ayrıca idrardaki hidroksiprolin düzeyinin değışiminin, sigara içimiyle akciğerde oluşan

hasardan kaynaklanabileceği gibi, kemik ve deri yıkımdan da kaynaklanabileceği unutulmamalıdır. İdrardaki hidroksiprolin düzeyini beslenme, hastalıklar, deri ve diğer dokulardaki kollajenin yıkımı da etkiler (Endres ve Rude, 1994; Christenson, 1997; Euli ve diğer., 1999). Bu nedenlerle idrardaki hidroksiprolinin kaynağını saptamak zordur. Bu kadar farklı etkenin olması, sigaranın idrardaki hidroksiprolin düzeyine etkisi hakkında farklı yorumların yapılmasına neden olmuştur. Tezimizde ise kontrol ve maruz grubu arasındaki en belirgin fark sigara içimi olduğundan, idrardaki hidroksiprolin düzeyini etkileyen diğer etkenler aynı kabul edilerek değişim sigarayla ilişkilendirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Adlkofer, F., Scherer, G., Heller, W.D., 1984. Hydroxyproline excretion in urine of smokers and passive smokers. *Preventive Medicine*, 13, 670-679.
- Ahnoff, M., Grundevik, I., Arfwidsson, A., Fonselius, J., Persson, B., 1981. Derivatization with 4-chloro-7 nitrobenzofurazan for liquid chromatographic determination of hydroxyproline in collagen hydrolysate. *Analytical Chemistry*, 53(3), 485-489.
- Auerbach, O., Hammond, E.D., Garfunkel, L. and Benaute, C. 1972. Relation of smoking and age to emphysema. Whole lung section study. *New Engand Journal Medicin*, 286, 853-857.
- Azonanotechnology. The A to Z of Nanotechnology. (n.d.). Retrieved October 5, 2011, from <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=2267>.
- Bağ ,H., Kendüzler, E., 2011. *Genel Kimya*. (3rd ed.). Pegem Akademi. Yenişehir, Ankara. 221 s.
- Barr, D.B., Wilder L.C., Caudill S.P., Gonzales A.J., Needham L.L., Pirkle J.L., 2005. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect*, 113(2), 192-200.
- Bellon, G ., Randoux, A., Borel, J.P., 1985. A study of collagen metabolism in cell cultures by fluorometric determination of proline and hydroxyproline. *Collagen Related Research*, 5, 423-435.
- Bergman, I., Loxley, R., 1970. The determination of hydroxyproline in urine hydrolysates. *Clinica Chimica Acta*, 27, 347-349.
- Bianchi, V., Mazza, L., 1995. Rapid reversed-phase high-performance liquid chromatographic method with double derivatization for the assay of urinary hydroxyproline. *Journal Chromatography B Biomedical Applications*, 665, 295-302.
- Brown, P.R., Hartwick, R.A., 1989. *High Performance Liquid Chromatography*, Wiley, New York. 472-479.
- Bornstein, P, Traub, W. 1979. The chemistry and biology of collagen. In: Neurath H, Hill RL, eds. *The proteins*. Academic Press. New York. 4, 411-632.
- Cassab, G.I., 1998. Plant cell wall proteins. *Annalu Reviev Plant Physiol and Plant Mol Biology*, 49, 281-309.
- Cheng, P.T.H., 1969. An Improved Method for the Determination of Hydroxyproline in Rat Skin. *J. Investigative Dermatology*, 53, 112-115.
- Chiavari, G., Fabbri, D., Prati, S., 2001. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of products arising from pyrolysis of amino acids in the presence of hexamethyldisilazane. *Journal Chromatography A*, 922, 235-241.
- Christenson, R.H., 1997. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clinical Biochemistry*, 30, 573-593.
- Chu, Q., Evans, B. T., Zeece, M. G. 1997. Quantitative separation of 4-hydroxyproline from skeletal muscle collagen by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B - Biomedical Applications*, 692(2), 293-301.

- Colgrave, M. L., Allingham, P. G., Jones, A., 2008. Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1212 (1-2), 150-153.
- Çuhadaroğlu, F.Z., 2010. Organik çözücü maruziyetinde idrarda hippürik asit düzeyinin belirlenmesi. (Yüksekisans Tezi). Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
- Dawson, C. D., Jewell, S., Otiskell, W. J., 1988. Liquid-Chromatographic Determination of Total Hydroxyproline in Urine. *Clinical Chemistry*, 34 (8), 1572-1574.
- DeRider, M.L., Wilkens, S.J., Waddell, M.J., Bretscher, L.E., Weinhold, F., Raines, R.T., Markley, J.L., 2002. Collagen stability: insights from NMR spectroscopic and hybrid density functional computational investigations of the effect of electronegative substituents on prolyl ring conformations. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 2497-2505.
- Dubovsky, J., Dubovska, E., Pacovsky, V., Hrba, J., 1968. Free and peptide hydroxyproline in chronic uremia. *Clinical Chimica Acta*, 19, 387-390.
- Einarsson, S., 1985. Selective determination of secondary amino acids using precolumn derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 348, 213-220.
- Elster, S. K., Lowry, E. L., 1950. Collagen content of guinea pig tissues. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 75, 127-129.
- Endres, D.B., Rude, R.K., 1994. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* (2nd ed.). Saunders, Pennsylvania, 1940-1945.
- Euli, D., Colombo, L., Mussini, E., 1999. Assay for 5-hydroxylysine and L-lysine in human and rat urine and in bone by gas chromatography. *Journal of Chromatography B*, 724, 373 p.
- Faruque, M.O., Khan, M.R., Rahman, M.M., Ahmed F., 1995. Relationship between smoking and antioxidant nutrient status. *British Journal of Nutrition*, 73, 625-632.
- Ferreira, L.A., Andrade, Z.A., 1993. Capillaria hepatica: a cause of septal fibrosis of the liver. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88, 441-447.
- García, L., Hernández, I., Sandoval, A., Salazar, A., Garcia, J., Vera J., 2002. Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, 37, 797-805.
- Gomes, A. T. B., Bastos, C. G., Afonso, C. L., Medrado, B. F., Andrade, Z. A., 2006. How variable are hydroxyproline determinations made in different samples of the same liver? *Clinical Biochemistry*, 39, 1160-1163.
- Harkness, M. L. R., Harkness, R. D. 1955. The growth of collagen in the foetus, placenta and foetal membranes of the rat *Journal of Physiology*, 128, 225-234.
- Henrikson, R.L., Meredith, S.C., 1984. SC Amino acid analysis by reverse phase high performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, 136, 65-71.
- Han, S.G., Lü, B.L., Ding, X.J., Zhang, J., Huang, M., 2012. Effects of H2 relaxin on airway remodeling and expression of cyclin D1 in a murine model of chronic asthma. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 35(5), 349-354.

- Holmgren, S.K., Taylor, K.M., Bretcher, L.E., Raines, R.T., 1998. Code for collagen's stability deciphered. *Nature* 392, 666-667.
- Hopkins, S.C., Palmieri, G.M., Niell, H.B., 1984. Total and nondialyzable hydroxyproline excretion in stage D2 prostate cancer. *Cancer*, 53, 117-121.
- Husek, P., Pohlidal, A., Slabik, D., 2002. Rapid screening of urinary proline-hydroxyproline dipeptide in bone turnover studies. *Journal of Chromatography B*, 767, 169-174.
- Ikehara, T., Habu, N., Nishino, I., Kamimori, H., 2005. Determination of hydroxyproline in rat urine by high-performance liquid chromatography with electrogenerated chemiluminescence detection using tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II). *Analytica Chimica Acta* 536, 129-133.
- Inoue, H., Kohashi, K., Tsurata, Y., 1998. Simultaneous determination of serum and urinary hydroxyproline and proline by liquid chromatography using two fluorescent labeling reagents. *Analytica Chimica Acta*, 365, 219-226.
- Jamall, I.S., Finelli, V.N., Qu Hee, S.S., 1981. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Analytical Biochemistry*, 112, 70-75.
- Jen, J., Hsiao, S., Liu, K., 2002. Simultaneous determination of uric acid and creatinine in urine by an eco-friendly solvent-free high performance liquid chromatographic method. *Talanta*, 58, 711-717.
- Jenkins, C.L., Raines, R.T., 2001. Insights on the conformational stability of collagen. *Natural Product Reports*, 19, 49-59.
- Jensen, J.A., Goodson, W.H., Williams, H., Hunt, T.K., 1991. Cigarette smoking decreases tissue oxygen. *Archives Surgery*, 126, 1131-1134.
- Jordan, K.M., Cooper, C., 2002. Epidemiology of osteoporosis. *Best Practice & Research: Clinical Rheumatology*, 16, 795 p.
- Kakinuma, M., Watanabe, Y., Hori, Y., Oh-i, T., Tsuboi, R., 2005. Quantification of hydroxyproline in small amounts of skin tissue using isocratic high performance liquid chromatography with NBD-F as fluorogenic reagent. *Journal of Chromatography B*, 824, 161-165.
- Kar, K., Kishore, N., 2007. Enhancement of thermal stability and inhibition of protein aggregation by osmolytic effect of hydroxyproline. *Biopolymers*, 87, 339-351.
- Karlson, P., 1992. *Tip ve Fen Bilimciler için Biyokimya*. (2nd ed.). 2-32.
- Kasuga, H., 1990. Indoor air quality. In: Paperback, Eds. *An introduction to the study of smoking using urinary hydroxyproline*. Springer-Verlag, Berlin.. 37-52.
- Kivirikko, K.I., Pihlajaniemi, T., 1998. Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology*, 72, 325-398.
- Kivirikko, K.I., 1993. Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Annals of Medicine*, 25, 113-126.
- Kivirikko, K.I., Laitinen, O., Prockop, D.J., 1967. Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Analytical Biochemistry*, 19, 249-255.
- Kochansky, C., Strein, T., 2000. Determination of uremic toxins in biofluids: creatinine, creatine, uric acid and xanthines. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 747 (1-2), 217-227.

- Kontturi, M.J., Sotaniemi, E.A., Larmi, T.K.I., 1974. Hydroxyproline in the early diagnosis of bone metastases in prostatic cancer. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 8, 91-95.
- Laurent, P., Janoff, A. and Kagan, H.M. 1983. Cigarette smoke blocks cross-linking of elastin in vitro. *The American review of respiratory disease*. 127, 189-192.
- LCresources. Getting started in HPLC. Section 1C. HPLC (n.d.). Instruments. Retrieved October 5, 2011, from <http://www.lcresources.com/resources/getstart/1c01.htm#top>.
- Lehninger, A.L., 1982. Vitamins and trace elements in the function of enzymes. Principles of biochemistry. *New York: Worth Publishers Inc.*, 249-276.
- Leroy, E.C., Kaplan, A., Udenfriend S., Sjoerdsma A., 1964. A hydroxyproline-containing, collagen-like protein in plasma and a procedure for its assay. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 3350-3356 p.
- Lin, Y., Kuan, C., 2010. Development of 4-hydroxyproline analysis kit and its application to collagen quantification. *Food Chemistry* 119, 1271-1277.
- Liu, Z., Sayre, L. M ., 2004. Synthesis of *N,N*-dimethyl-2,4-dinitro-5-fluorobenzylamine and its reactions with aminoacids and peptides. *Tetrahedron*, Volume 60, Issue 7, 1601-1610.
- Lowry, O. H., Gilligan, D. R., Katersky, E. M., 1941. The determination of collagen and elastin in tissues, with results obtained in various normal tissues from different species. *Journal of biology Chemistry*, 139, 795-804.
- Lowry, O. H., Hastings, A. B., Mccay, C. M., Brown, A. N., 1946. Histochemical changes associated with aging. IV. Liver, brain and kidney in the rat. *Journals of Gerontology*, 1, 345-357.
- Measure Central. (n.d.). Retrieved October 5, 2011, from <http://www.measurecentral.com/technology/glossary.php>.
- Mee, J.M.L., 1973. Specific assay of hydroxyproline by gas chromatography. *Journal of Chromatography*. 87, 155-161.
- Merwe, S.W., Bogaerde, J.B., Goosen, C., Maree, F.F., Milner, R.J., Schnitzler, C.M., Biscardi, A., Mesquita, J.M., Engelbrecht, G., Kahn, D., Fevery, J., 2003. Hepatic osteodystrophy in rats results mainly from portasystemic shunting. *Gut*, 52, 580-585.
- Milsom, J.P., Craig, R.D.P., 1973. Collagen degradation in cultured keloid and hypertrophic scar tissue. *British Journal of Dermatology*, 89, 635-644.
- Mooppan, M.M.U., Kim, H., Wang, J.C., Tobin, M.S., Wax, S.H. 1983. Use of urinary hydroxyproline excretion as a tumor marker in diagnosis and follow-up of prostatic carcinoma. *Prostate* 4, 397-405.
- Morris, A., Gonsalves, R. Collogen. (n.d.). Retrieved October 5, 2011, from <http://chempolymerproject.wikispaces.com/Collagen++B+rgam>.
- Mussini, E., Marcucci, F., 1966. A method for the gas-chromatographic analysis of N-acetylaspartic acid in brain *Journal of Chromatography*. 25, 11-14.
- Myllyharju, J., 2003b. Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biology*, 22, 15-24.
- Myllyharju, J., Kivirikko, K.I., 2001. Collagens and collagen-related diseases. *Annals of Medicine*, 33, 7-21.
- Neubert, A., Remer, T., 1998. The impact of dietary protein intake on urinary creatinine excretion in a healthy pediatric population. *Journal of Pediatrics*, 133(5), 655-659.

- Niell, H.B., Neely, C.L., Palmieri, G.M., McDonald, M.W., 1983. The postabsorptive hydroxyproline in the long-term evaluation of patients with breast cancer. *Cancer* 52, 1442-1447.
- Paronetto, F, Popper, H. 1966. Chronic liver injury induced by immunologic reactions. Cirrhosis following immunization with heterologous sera. *American Journal of Pathology*, 40, 1087-1101.
- Paroni, R., Vecchi, E. De, Fermo, I., Arcellom, C., Diomede, L., Magni, F., Bonini, P. A. 1992. Total Urinary Hydroxyproline Determined with Rapid and Simple High Performance Liquid Chromatography. *Clinical Chemistry*, 38 (3), 407-411.
- Pihlajaniemi, T., Myllyla, R., Kivirikko, K.I., 1991. Prolyl 4-hydroxylase and its role in collagen synthesis. *Journal of Hepatology*, 13, 2-7.
- Powles, T.J., Rosset, G., Leese, C.L., Bondy, P.K., 1976. Early morning hydroxyproline excretion in patients with breast cancer. *Cancer* 38, 2564-2566.
- Prockop, D.J., Kivirikko, K., 1967. Relationship of hydroxyproline excretion in urine to collagen metabolism. *Annals of Internal Medicine*, 66, 1243-1266.
- Prockop, D.J., Kivirikko, K.I., 1995. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 403-434.
- Pryor, W.A., 1984. Free radicals in antoxidation and aging. In Amstrong, D. Ed., *Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease*. Raven Press. New York. 13 p.
- Quasnichka, H. L., Tarlton, J. F., Anderson-Mackenzie, J. M., Billingham, M. E., Bailey, A. J., & Pickford, A. R., 2005. Development of an assay for the quantification of type I collagen synthesis in the guinea pig. *Journal of Immunological Methods*, 297 (1-2), 133-141.
- Ramaswami, S.G., Adams, E., 1977. One-vessel synthesis of 4-hydroxyproline from glyoxal and oxaloacetic acid. *Journal of Organic Chemistry*, 42, 3440-3442.
- Ramos, S.G., Montenegro A.P., Goissis G., Rossi M.A., 1994. Captopril reduces collagen and mast cell and eosinophil accumulation in pig serum-induced rat liver fibrosis. *Pathology International*, 44, 655-661.
- Reed, P., Holbrook, I. B., M. Gardner, L. G., McMurray, J. R., 1991. Simple, Optimized Liquid Chromatographic Method for Measuring Total Hydroxyproline in Urine Evaluated. *Clinical Chemistry*, 37 (2), 285-290
- Rickert, W.S. 1972. Altered susceptibility of collagen to collagenase digestion as a consequence of exposure to tobacco smoke. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 49, 793-798.
- Rosenbloom, J., Abrams, W.R., 2002. Elastin and the microfibrillar apparatus. In: Royce PM Steinmann B (eds) *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*, Wiley-Liss. Inc. New York. 249-269.
- Scriver, C.R., Smith, R.J., Phang, J.M., 1983. Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In: Stanbuiy JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS, eds. *The metabolic basis of inherited diseases*, 5th ed. New York: McGraw Hill, 360-381.
- Showalter, A.M., 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 5, 9-23.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 1998. *Principles of Instrumental Analysis* (5th ed.). Orlando, Florida. 675-777.

- Smith, E.M., Swiss, G.F., Neustadt, B.R., Gold, E.H., Sommer, J.A., Brown, A.D., Chiu, P.J.S., Moran, R., Sybert, E.J., Baum, T., 1988. Synthesis and pharmacological activity of angiotensin converting enzyme inhibitors: N-(mercaptoacyl)-4-substituted-(S)-prolines. *Journal of Medical Chemistry*, 31, 875-885.
- Sorensen, L.T., Nielsen, H.B., Kharazmi, A., Gottrup, F., 2004. Effect of smoking and abstention on oxidative burst and reactivity of neutrophils and monocytes. *Surgery*, 136, 1047-1053.
- Sorensen, L.T., Jorgensen, L.N., Zillmer, R., Vange, J., Hemmingsen, U., Gottrup, F., 2006. Transdermal nicotine patch enhances type I collagen synthesis in abstinent smokers. *Wound Repair and Regeneration*, 14(3), 247-251.
- Souza, M.M., Paraná, R., Trepo, C., Barbosa, Jr A.A., Oliveira, I., Andrade, Z.A., 2001. Effect of interferon- α on experimental septal fibrosis of the liver—Study with a new model. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (3), 343-348.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., 1979. Introduction to Modern liquid chromatography, second edition, New York, Wiley.
- Stratford, M. R.L. , Watfa, R. R., Murray, J. C., Martin, S. G., 1990. Determination of collagen and protein turnover by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 526, 383-395.
- Teerlink, T., Tavenier, P., Netelenbos, J.C., 1989. Selective determination of hydroxyproline in urine by high-performance liquid chromatography using precolumn derivatization. *Clinical Chimica Acta*, 31; 183 (3), 309-315.
- Terabe, S., Ishihama, Y., Nishi, H., Fukuyama, T., Otsuka, K., 1991. Effect of urea addition in micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography*, 359-368.
- Todoroki, K., 2011. Development of novel fluorescence-derivatization-HPLC methods enabling highly sensitive and selective analysis of biological compounds. *Yakugaku Zasshi*, 131 (8), 1207-1211.
- Tortora, G.J., Grabowski, S.R., 1996. *Principles of Anatomy and Physiology* (8th ed.). HarperCollins College Publishers, New York, 145 p.
- Tredget, E.E., Falk, N., Scott, P.G., Hogg, A.M., Burke, J.F., 1990. Determination of 4-hydroxyproline in collagen by gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 259- 265.
- Tsuruta, Y., Inoue, H., 1998. 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride as a fluorescent labeling reagent for determination of amino acids in high-performance liquid chromatography and its application for determination of urinary free hydroxyproline. *Analytical Biochemistry*, 15-21.
- Tunçel, N., Aydın, S., Zeytinoğlu, M., 2006. *İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi*. Anadolu Üniversitesi Yay. Eskişehir. 225-235.
- Tural, H., 2004. *Analitik Kimya*. 3.baskı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Bornova, İzmir. 350-369.
- Welch, R.W., Acworth, I, Levine, M., 1993. Coulometric electrochemical detection of hydroxyproline using 7-chloro- 4- nitrobenzo- 2- oxa-1,3- diazole. *Analytical Biochemistry*, 210, 199-205.
- Weston, A., Brown, P.R., 1998. HPLC and CE, Principles and Practice. *Analytical Biochemistry*, 150-164
- Wicke, C., Halliday, B., Scheuenstuhl, H., Foree, E.F., Hunt, T.K., 1995. Examination of expanded polytetrafluoroethylene wound healing models. *Wound Repair and Regeneration*, 3, 284-291.

- Woessner, J.F., 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 93, 440-447.
- Woo, K.L., Lee, D.S., 1995. Capillary gas chromatographic determination of proteins and biological amino acids as N(O)-tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography. B*, 665, 15-25.
- Yaşam Blimleri (n.d.). Retrieved October 5, 2011, from http://csis-text3.c.tokyo.ac.jp/active/11_05.html.
- Zuo, Y., Wang, C., Zhou, J., Sachdeva, A., Ruelos, V., 2008. Simultaneous determination of creatinine and uric acid in human urine by high performance liquid chromatography. *Analytical Science*, 24 (12), 1589-1592.

EK-1**KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KURULU
DEĞERLENDİRME FORMU**

DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu
AÇIK ADRES	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/Ankara
TELEFON	0312 310 30 10/227
FAKS	0312 310 63 70
E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Toplumumuzda silikozis gelişiminde rol oynayan aday gen polimorfizmlerinin ve DNA hasarının araştırılması ile maruziyetle ilgili biyogösterge olarak hidroksiprolin düzeyinin belirlenmesi		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU			
	EUDRACT NUMARASI			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Tülin Söylemezoglu		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Toksikoloji		
	KOORDİNATORÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI			
	KOORDİNATORÜN UZMANLIK ALANI			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü		
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ			
	BAŞVURULAN DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu		
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input checked="" type="checkbox"/>	

ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	
	FAZ 2	<input type="checkbox"/>	
	FAZ 3	<input type="checkbox"/>	
	FAZ 4	<input type="checkbox"/>	
	BE/BY	<input type="checkbox"/>	
	DİĞER	<input type="checkbox"/>	Diğer ise belirtiniz:

ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>
-------------------------------	-------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------	---------------------------------------

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>
	İLAN	<input type="checkbox"/>
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>
DİĞER	<input type="checkbox"/>	

Zeynep
A.Ü. Tıp Fakültesi
Fakülte Sekreter V.

10 Nisan 2011

Zeynep

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Betül Kaya
Doğum Yeri ve Yılı : Çankırı 1986
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce



Eğitim Durumu

Lise : Çankırı Fen Lisesi (2001-2004)
Lisans : Ege Üniversitesi; Fen Fakültesi; Biyokimya Bölümü (2004-2009)

Çalıştığı Kurum: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi; Fen-Edebiyat Fakültesi; Kimya Bölümü (2010-)

